

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

218

ANNÉE 1942

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Josette CANAT

Née le 12 mai 1916, à Bordeaux (Gironde)

Présentée et soutenue publiquement le 104 JUL 1942 194

RAPPORTS

ENTRE LES

HÉMOLYSINES ET LES AGGLUTININES

Application des Hémolysines
à la Classification des Sangs

Président : M. TROISIER, Professeur.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{te}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1942

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : **CANAT.**

Prénom : **Josette.**

Nom de jeune fille :

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

1

CANAT (Josette). — Rapports entre les Hémolysines et les Agglutinines (application des hémolysines à la classification des sangs). — Paris, Jouve et Cie, édit., 1942. In-8°, 76 p.

(Thèse de Médecine (Etat), Paris, 1942, N°.....).

2

CANAT (Josette). — Rapports entre les Hémolysines et les Agglutinines (application des hémolysines à la classification des sangs). — Paris, Jouve et Cie, édit., 1942. In-8°, 76 p.

(Thèse de Médecine (Etat), Paris, 1942, N°.....).

3

CANAT (Josette). — Rapports entre les Hémolysines et les Agglutinines (application des hémolysines à la classification des sangs). — Paris, Jouve et Cie, édit., 1942. In-8°, 76 p.

(Thèse de Médecine (Etat), Paris, 1942, N°.....).

4

CANAT (Josette). — Rapports entre les Hémolysines et les Agglutinines (application des hémolysines à la classification des sangs). — Paris, Jouve et Cie, édit., 1942. In-8°, 76 p.

(Thèse de Médecine (Etat), Paris, 1942, N°.....).

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1942

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Josette CANAT

Née le 12 mai 1916, à Bordeaux (Gironde)

Présentée et soutenue publiquement le 194

RAPPORTS

ENTRE LES

HÉMOLYSINES ET LES AGGLUTININES

Application des Hémolysines
à la Classification des Sangs

Président : M. TROISIER, Professeur.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1942

LE DOYEN... BAUDOUIN

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	POLONOVSKI.
Bactériologie	GASTINEL.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	N...
Pathologie chirurgicale	QUÉNU.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	AUBERTIN.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	DUVOIR.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	N...
Pathologie expérimentale et comparée	Henri BENARD.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CHIRAY.
	ABRAMI.
Clinique médicale	FIESSINGER.
	HARVIER.
	PASTEUR-VALLERY-RADOT.
Hygiène et clinique de la première enfance	CATHALA.
Clinique des maladies des enfants	Robert DEBRÉ.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	LAIGNEL-LAVASTINE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CADENAT.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	LENORMANT.
	MONDOR.
Clinique ophtalmologique	VELTER.
Clinique urologique	CHEVASSU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	LÉVY-SOLAL.
	PORTES.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LEVEUF.
Clinique thérapeutique médicale	LOEPER.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	BROCQ.
Clinique propédeutique	M. VILLARET.
Clinique de la tuberculose	TROISIER.
Clinique chirurgicale orthopédique	MATHIEU.
Clinique de cardiologie	DONZELOT.
Clinique de neuro-chirurgie	Clovis VINCENT.
Assistance médico-sociale	N...
	DOGNON.
	GIROUD.
	HAZARD.
Professeurs sans chaire	JAYLE.
	JOANNON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

AMELINE Pathologie chirurgicale.
BARIÉTY..... Pathologie médicale.
BERNARD (Etienne). Pathologie médicale.
BESANÇON (Justin). Hydrologie.
BONNET Bactériologie.
BOULIN..... Pathologie médicale.
BROUET Pathologie médicale.
BULLIARD.... Histologie.
CACHERA..... Pathologie médicale.
CORDIER Anatomie.
COSTE..... Pathologie médicale.
COUVELAIRE (Roger). Urologie.
DELARUE Anatomie pathologique.
DELAY Pathologie médicale.
DEGREZ (H.).. Physique.
DESOILLE Médecine légale.
DIGONNET.... Obstétrique.
DOGNON..... Physique.
FEVRE Pathologie chirurgicale.
FUNCK-BRENTANO. Pathologie chirurgi-
cale.
GALLIARD.... Parasitologie.
GARCIN..... Pathologie médicale.
M^{lle} GAUTHIER-VILLARS. Anatomie pa-
thologique.

MM.

DE GENNES... Pathologie médicale.
HAGUENAU... Pathologie médicale.
LACOMME..... Obstétrique.
LANTUÉJOUL. Obstétrique.
LAVIER..... Parasitologie.
LELONG..... Pathologie médicale.
LEMAIRE Pathologie expérimentale.
LENÈGRE Pathologie médicale.
M^{lle} J. LÉVY... Pharmacologie.
MARCHAL Pathologie médicale.
MÉNÉGAUX... Pathologie chirurgicale.
MOLLARET ... Pathologie médicale.
MOUQUIN..... Pathologie médicale.
PATEL..... Pathologie chirurgicale.
PETIT-DUTAILLIS. Pathologie chirurgicale.
RENARD..... Ophtalmologie.
RICHET..... Physiologie.
SÉNÈQUE..... Pathologie chirurgicale.
SICARD Pathologie chirurgicale.
SOULIE Pathologie médicale.
SUREAU Obstétrique.
TURPIN..... Pathologie médicale.
WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE..... Pathologie chirurgicale.
CHAILLEY-BERT Physiologie.
GUÉNIOT..... Obstétrique.
HEITZ-BOYER... Pathologie chirurgicale.
HUGUENIN Anatomie pathologique.

MM.

LE LORIER..... Obstétrique.
NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
PIÉDELIEVRE .. Médecine légale.
VAUDESCAL..... Obstétrique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ALAJOUANINE...	} Clinique médicale.	BASSET	} Clinique chirurgicale.
BRULÉ.....		GATELLIER...	
CHABROL.....		de GAUDART	
CHEVALLIER....		d'ALLAINES	
LAROCHE Guy...		MOULONGUET	
LIAN		MOURE	
MOREAU			
SÉZARY			

MM.	
ECALLE.....	} Clinique obstétricale.
VIGNES.....	

V. — CHARGES DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
DECHAUME	Stomatologie.
N.	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

*En témoignage de mon affection et de
ma profonde reconnaissance.*

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TROISIER

Professeur de la clinique de Tuberculose à la Faculté
Médecin de l'Hôpital Laënnec
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui m'a fait le grand honneur d'ac-
cepter la présidence de cette thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TRÉFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommages très respectueux.

A MONSIEUR R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

Secrétaire Général de l'Institut Pasteur
Officier de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu nous accueillir dans
son service. En témoignage de gratitude
pour la sollicitude qu'il nous a toujours
montrée.*

A MON MAITRE

LE DOCTEUR N. KOSSOVITCH

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur
Ancien Professeur à l'Ecole d'Anthropologie de Paris

*Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse
et nous a permis sa réalisation en nous
prodiguant ses conseils éclairés et bien-
veillants.*

*Qu'il trouve ici l'expression de notre pro-
fonde reconnaissance et de notre respec-
tueux dévouement.*

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ FEY

Chirurgien de l'Hôpital Cochin

*En témoignage de gratitude et de vive
reconnaissance pour l'aide et la bienveil-
lance qu'il nous a manifestée en toutes
circonstances.*

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

Stage :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CARNOT

MONSIEUR LE PROFESSEUR GOSSET

MONSIEUR LE DOCTEUR HENRI BENARD

Externat :

MONSIEUR LE PROFESSEUR OMBRÉDANNE

MONSIEUR LE DOCTEUR BERGER

MONSIEUR LE PROFESSEUR GOUGEROT

MONSIEUR LE DOCTEUR LAEDERICH

MONSIEUR LE DOCTEUR TIXIER

MONSIEUR LE PROFESSEUR LANTUÉJOUL

MONSIEUR LE PROFESSEUR TURPIN

A MONSIEUR LE DOCTEUR LUCIEN BARON

*En témoignage de vive reconnaissance
et de respectueux attachement.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES MIALARET

Chirurgien des Hôpitaux de Paris

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN CATINAT

Assistant à l'Hôpital Saint-Antoine

RAPPORTS

ENTRE LES HÉMOLYSINES ET LES AGGLUTININES

**Application des Hémolysines
à la Classification des Sangs**

INTRODUCTION

Effectuant des réactions de Wassermann en série, notre attention a été attirée par la constatation d'un phénomène curieux : la coexistence d'une agglutination avec l'hémolyse. Cette agglutination inhibait partiellement où même totalement l'hémolyse si bien que nous étions conduit à une fausse interprétation des résultats, prenant pour subpositive ou même positive une réaction qui était en réalité, franchement négative (Hémolyse complète dans tous les tubes). L'hypothèse d'une interdépendance possible entre agglutinines et hémolysines d'un même sérum nous a incité à pousser plus avant l'étude de ce phénomène. Passant ensuite à un plan plus général, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude systématique des rapports sérologiques souvent très étroits qui unissent les hémolysines et agglutinines, étude poursuivie tant avec les hétéro-anticorps qu'avec les iso-anticorps.

K. Meyer fut le premier, en 1922, à observer et à relater le phénomène dont nous parlons, dans la suite, d'autres auteurs signalèrent le même fait avec le sérum de sujets qui, pour des raisons de traitement et de prophylaxie antidiphthérique ou antitétanique avaient reçu des injections de sérum de cheval. Plus curieuses encore sont les observations de malades atteints d'angine à monocytes, chez lesquels on constata une forte augmentation des agglutinines naturelles qui existent chez la plupart des hommes pour les globules rouges de mouton. Cette constatation a d'ailleurs servi de base à la séro-réaction de Hanganutziu et Deicher, appliquée par Paul et Bunnell au diagnostic de la monocytose infectieuse.

Qu'un anticorps puisse inhiber l'action d'un autre anticorps au cours d'une réaction permettrait peut-être de prévoir entre eux des liens très étroits, une parenté très proche. La notion de la dépendance intime des divers anticorps ébranle quelque peu la théorie d'Ehrlich et de ses collaborateurs, qui, à l'aube de la science immunologique, s'étaient au contraire efforcés de montrer l'absolue délimitation de ceux-ci. Il s'agissait pour eux, d'entités parfaitement individualisées, sans aucun lien réel. Cependant, cette théorie a subi depuis quelques révisions, qui ont montré qu'il existe, au contraire, toute une série de caractères communs entre les divers anticorps fixés sur la même molécule globulinique, anticorps obtenus par immunisation au moyen d'un antigène composé. C'est ainsi qu'agglutinines et précipitines ne contri-

buent peut-être qu'à l'extériorisation des différentes formes d'un seul et même phénomène.

Par la suite, certains auteurs ont tenté d'expliquer les multiples propriétés d'un sérum en ayant recours à l'analyse chimique. Les résultats n'ont pas été très concluants, car les méthodes employées, telles que le fractionnement d'un sérum par électro-ultrafiltration, n'ont permis qu'une analyse superficielle. Signalons dès maintenant que, dans ce travail sur les corrélations entre hémolysines et hém-agglutinines, tant artificielles que naturelles, nous avons fait exclusivement appel à des données sérologiques, essayant d'expliquer les phénomènes observés par les seules règles de l'immunité, à l'exclusion de toute notion physico-chimique.

CHAPITRE I

Etude des hétéro-anticorps.

Rappelons ici pour mémoire quelques notions d'immunologie bien connues depuis Ehrlich, Bordet, Morgenroth et d'autres.

Si l'on immunise un lapin en lui injectant des globules rouges de mouton, on voit apparaître dans son sérum, après un certain temps, des anticorps tels que, remis en contact avec des globules de mouton, ils déterminent simultanément l'agglutination de ces derniers et leur hémolyse en présence de complément. Autrement dit, l'antigène pris comme exemple possède deux récepteurs, qui provoquent l'apparition dans le sérum du lapin de deux ambocepteurs (hémolysines et agglutinines) susceptibles de déclencher *in vitro* deux immuno-réactions, si on les fait agir sur l'antigène qui a servi à leur formation.

Ces substances qui, déterminées artificiellement dans le sérum d'un animal sont destinées à agir sur les globules rouges d'un animal d'une autre espèce, portent le nom d'immuno-hétéro-anticorps.

Nous nous efforcerons de montrer qu'il existe un

réel parallélisme entre l'apparition de ces deux hétéro-anticorps chez l'animal immunisé et leur disparition partielle ou complète lors de leur adsorption au moyen du même récepteur.

Si ces constatations sont faites, elles nous permettent d'établir l'existence d'une parenté très réelle entre hémolysines et agglutinines, non seulement parenté d'origine, mais parenté d'action étant donné l'extrême dépendance des immuno-réactions auxquelles elles donnent naissance.

Hémolysines et agglutinines ont-elles à la base un même anticorps doué de deux fonctions différentes, ou bien deux anticorps qui seraient fixés sur une même fraction de la molécule protéidique ? C'est un problème qui retiendra notre attention.

Nous ne pouvons ignorer que ces anticorps possèdent, à côté d'ambocepteurs spécifiques, des ambocepteurs communs répondant à des récepteurs communs de l'antigène. Est-il en effet besoin de rappeler que, si l'on immunise un lapin avec des globules rouges de mouton, son sérum renfermera des immuno-hétéro-anticorps, non seulement anti-mouton, mais aussi anti-homme, et qu'inversement un lapin préparé avec des injections de globules rouges humains des groupes A ou AB donnera un sérum doué d'agglutinines et d'hémolysines anti-homme, mais également anti-mouton ? Les globules humains et les globules de mouton possèdent donc des récepteurs communs.

Les expériences relatées dans ce chapitre avec leur

technique sont destinées à mettre en évidence toutes ces corrélations.

**Technique pour l'obtention
des sérums agglutinants et hémolysants
anti-homme et anti-mouton.**

Nous avons choisi le lapin comme animal d'immunisation. Un premier lot a été préparé avec des globules rouges de mouton, un deuxième lot avec des globules humains. Ces hématies lavées avec du sérum physiologique jusqu'à complète disparition des protéines dans l'eau de lavage, ont servi à préparer une émulsion à 50 %. Trois injections de 3 cc. chacune ont été faites dans la veine marginale de l'oreille à 3 jours d'intervalle. La 4^e et la 5^e injections étaient intrapéritonéales, rendant possible une injection de 10 cc. Au cours de l'immunisation, deux ou trois prises de sang ont permis de déterminer le titre du sérum et d'une façon générale, 8 à 10 jours après la dernière injection, l'animal pouvait être saigné. Nous avons inactivé ce sérum au bain-marie à 56° pendant 30 minutes.

Titrage du pouvoir agglutinant de ce sérum.

Nous avons effectué ce titrage dans des tubes à hémolyse, suivant la méthode acceptée par la Société des Nations. Des dilutions de sérum sont réalisées suivant une progression géométrique descendante :

$1/1$, $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, etc. On porte 0^{cc}. 1 de chacune des dilutions précédentes dans une série de tubes préparés à l'avance et l'on ajoute à chacun 0^{cc}. 1 d'une émulsion de globules rouges à 5 %. Après avoir bien agité le mélange, les tubes sont laissés 2 à 3 heures à la température du laboratoire. La lecture se fait à l'œil nu.

Titrage du pouvoir hémolytique.

Nous avons eu recours successivement à deux méthodes :

A. — Celle qui utilise pour ce titrage le sérum frais actif.

C'est le principe classique employé par le Professeur Troisier dans son travail sur « Le rôle des hémolysines dans la genèse des pigments biliaires et de l'urobiline » nous avons légèrement modifié cette technique de la façon suivante : des dilutions de sérum ont été effectuées ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/10$) elles n'ont pas dépassées $1/10$ pour ne pas trop affaiblir le complément naturel. Deux gouttes de ces dilutions ont été mises en présence de 8 gouttes d'eau physiologique, et d'une goutte d'une émulsion de globules rouges à 5 %. Ces mélanges étaient ensuite portés à l'étuve à 37° pendant trente minutes.

B. — *Celle qui titre un sérum inactivé par chauffage, auquel on ajoute du complément de cobaye.*

On réalise des dilutions plus élevées de sérum chauffé trente minutes à 56° et l'on prélève 0 cc. 5 de chacune d'entre elles dans des tubes à hémolyse. On complète avec 0 cc. 5 de complément à 1/10 (sérum frais de cobaye) et 0 cc. 5 d'une émulsion de globules rouges lavés à 5 %, on porte de la même façon ces tubes trente minutes à l'étuve.

Nous ne reviendrons plus sur ces techniques de l'agglutination, et de l'hémolyse qui seront toujours les mêmes au cours de notre étude.

A. — PARALLÉLISME DANS L'APPARITION DES ANTICORPS HÉMOLYTIQUES ET AGGLUTINANTS

**Apparition simultanée des différents
immuno-anticorps spécifiques anti-homme.
Inégalité de leur titre.**

Lorsqu'on prépare un lapin au moyen d'injections de globules rouges humains, on voit apparaître simultanément dans son sérum les anti-corps hémolytiques et agglutinants ; on peut même suivre leur développement simultané en pratiquant quelques saignées au cours de l'immunisation, mais d'emblée, on constate une grosse différence dans les titres obtenus. Dans tous les sérums anti-homme préparés ainsi,

nous avons décelé un pouvoir agglutinant élevé jusqu'à $1/3000$. Par contre, le titre hémolytique s'est montré faible ne dépassant pas $1/20$ dans la plupart des cas, et invariable quel que soit le groupe des globules rouges employés comme antigène.

Si l'on substitue au sérum de cobaye utilisé comme complément du sérum de lapin ou du sérum humain, le titre tombe encore et n'atteint plus que $1/2$, $1/4$ ou $1/8$.

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché le titre du pouvoir agglutinant et hémolysant, en mettant en contact le même immunsérum (préparé par injections de globules rouges A chez un lapin) avec plusieurs lots de globules A provenant de sujets différents. Dans un 2^e temps, nous avons, au contraire, mis en présence plusieurs immunsérums (provenant de lapins préparés avec des globules A de sujets différents) avec un seul et même lot de globules A. En faisant ainsi varier les antigènes et les immunsérums, nous avons pu constater des oscillations assez importantes dans les taux d'agglutinabilité et d'hémolyse, mais, tandis que le pouvoir agglutinant oscillait entre $1/256$ et $1/2048$, le titre hémolytique ne dépassait pas $1/32$; donc formation simultanée des deux anticorps, mais grosse difficulté pour l'obtention d'un bon sérum hémolytique anti-homme si l'on se sert des globules humains comme antigènes. Hesser, qui a beaucoup étudié cette question, a montré que, dans ce cas, il y avait développement brusque des agglutinines et, par contre, développe-

ment lent et faible des hémolysines anti-homme tandis qu'on observait un rapport exactement inverse dans la production des anticorps lorsque l'immunisation était faite avec des globules de mouton.

C'est ainsi qu'en immunisant des lapins avec des globules rouges de mouton, on obtient un sérum dans lequel se sont développés en même temps les anticorps hémolytiques et agglutinants anti-mouton, mais cette fois, le titre des hémolysines anti-mouton est très élevé (titre moyen 1/2000), tandis que celui des agglutinines est assez faible (titre moyen 1/64).

Variété des anticorps suivant la nature de l'antigène considéré.

Bordet avait bien montré qu'un seul et même antigène peut provoquer la formation de plusieurs anticorps répondant à des espèces animales différentes. C'est ainsi que, si l'on injecte des globules de lapin à un cobaye, le sérum de ce dernier est doué de propriétés hémolytiques non seulement à l'égard du lapin, mais à l'égard des souris et des rats. De même Ehrlich et Morgenroth préparaient un sérum anti-bœuf qui était fortement hémolytique pour les globules de bœuf, mais l'était aussi, quoique à un degré moindre, pour la chèvre et le mouton.

Dans l'exemple qui nous intéresse, si au lieu d'avoir immunisé nos lapins avec des hématies de n'importe quel groupe, nous n'avions pris que des

globules rouges du groupe A ou AB, nous aurions vu se développer dans le sérum de nos lapins, non seulement des hémolysines et des agglutinines anti-homme, mais — fait plus curieux — des hémolysines et des agglutinines anti-mouton. Et inversement, si nous préparons nos lapins au moyen de globules rouges de mouton, nous donnons naissance à des anticorps anti-mouton, mais parallèlement à des ambocepteurs anti-homme. Ici encore, apparition simultanée des hémolysines et agglutinines anti-homme et anti-mouton.

**Inégalité des titres entre hétéro-anticorps
spécifiques et hétéro-anticorps non spécifiques.**

S'il y a incontestablement formation simultanée de ces anticorps, il n'y a aucun parallélisme dans le développement de leurs titres respectifs. Erlich et Morgenroth avaient cru pouvoir affirmer, en se basant sur la grande majorité des cas, qu'il y avait une différence dans le titre des hémolysines obtenues, le titre le plus élevé correspondant à l'hémolyse des globules ayant eux-mêmes servi d'antigène ; ces hémolysines portent alors le nom d'« hémolysines primaires » pour les globules homologues ; le titre hémolytique est plus bas pour les globules des autres espèces animales, ce sont les « hémolysines subsidiaires » ou hétérolysines. Or, nos expériences sont en contradiction avec les données précédentes. En effet, lors de l'immunisation d'un lapin au moyen de globules

humains du groupe A, parmi les hémolysines obtenues, celles qui ont le titre le plus élevé sont justement les hémolysines anti-mouton, et non les hémolysines anti-hommes. Nous avons, en effet, montré que le titre de ces dernières était toujours faible. Le tableau que nous présentons d'après nos expériences indique que le sérum hémolytique anti-mouton obtenu au moyen d'antigène humain (globules A ou AB) peut atteindre un titre de 1/4.000.

Immuno-sérum anti-mouton		Complément au 1/10 ^e	Globules rouges de mouton à 5 %	Étuve à 37°	Résultats
Dilutions	1/100 ^e -1/1.000 ^e	0 cc. 1	1 cc.	30'	H. +++
	1/2.000 ^e	—	—		++++
	1/3.000 ^e	—	—		++++
	1/4.000 ^e	—	—		++++
Témoins	1/100 ^e	0	1 cc.		H. 0
	0	0,1	1 cc.		0

Si l'on emploie un autre sérum que celui de cobaye comme complément, le titre tombe à 1/50 au maximum.

Ces notions, à première vue paradoxales, ont été signalées dans la littérature par Marshall, Brezina, Kritchevsky, Friedberger, Schiff, Forssman et autres. Ces auteurs ont montré que les immunsérums ont parfois un pouvoir hémolytique plus élevé pour les globules hétérologues que pour les homologues, c'est-à-dire ceux qui ont servi comme antigène. Ils ont également fait ressortir que les hémolysines anti-

mouton sont douées d'un pouvoir hémolytique plus spécifique que les isolysines (c'est-à-dire les sérums anti-mouton préparés avec des globules de mouton).

Il nous a paru intéressant de suivre l'apparition et le développement du titre des anticorps anti-homme et anti-mouton suivant la quantité d'antigène injecté, et ce que devenait ce titre après la période d'immunisation. Dans ce but nous avons effectué des prises de sang chez le lapin avant et au cours de l'immunisation, suivies chaque fois du titrage des agglutinines anti-homme et des hémolysines anti-homme et anti-mouton. La même vérification a été faite 5 jours, puis 10 jours, et enfin, 15 jours après la cessation des injections. Ce sont des globules provenant des mêmes personnes qui ont servi aussi bien pour l'immunisation qu'ultérieurement pour les séro-réactions d'agglutination et d'hémolyse:

	Titre hémolytique		Titre des agglutinines
	Gl. r. humains	Gl. r. de mouton	Gl. r. humains
Avant l'inoculation.....	1 : 2	1 : 4	1 : 4
Après inject. intra-vein. 3 cc. ...	4	8	8
— — 6 cc. ...	16	128	256
— — 9 cc. ...	16	1.024	1.024
Après inject. intra-périton. 10 cc.	16	2.048	2.048
5 jours après la dernière inj. ...	< 32	2.048	2.048
10 — — ...	16	1.024	1.024
15 — — ...	8	512	512

Nous voyons une fois de plus, sur ce tableau, que, bien que ces anticorps apparaissent ensemble dans le

sérum du lapin immunisé au moyen du même antigène, leurs titres diffèrent dès le début, il est curieux de constater que c'est le pouvoir agglutinant anti-homme qui augmente parallèlement au pouvoir hémolytique anti-mouton.

INTERPRÉTATION DE CES TABLEAUX THÉORIE DES RÉCEPTEURS COMMUNS

Comment comprendre que des globules humains injectés à un lapin déterminent, non seulement des anti-corps anti-homme, mais aussi anti-mouton, et qu'inversement, des injections de globules de mouton servent à préparer des hémolysines et des agglutinines pour les globules humains aussi bien que pour ceux de mouton, si ce n'est à la lumière de la théorie d'Ehrlich sur les récepteurs communs contenus dans les antigènes ? Des antigènes différents, comme les globules humains et les globules de mouton, posséderaient, à côté de récepteurs spécifiques, des groupes de récepteurs communs à ces deux antigènes ; parallèlement on obtiendrait, lors de l'immunisation, un immunsérum renfermant des ambocepteurs spécifiques répondant aux récepteurs spécifiques et des ambocepteurs communs correspondant au groupe des récepteurs communs. D'autre part, si un antigène est composé de plusieurs groupes de récepteurs identiques, l'affinité ou l'avidité de l'anticorps pour cet antigène est très augmentée.

Dès lors nous pouvons penser qu'en immunisant

un lapin avec des hématies du groupe A, l'hémolysine et l'agglutinine anti-homme correspondent aux récepteurs spécifiques de l'antigène, tandis que l'hémolysine anti-mouton répond à un groupe de récepteurs communs aux globules rouges humains et aux globules de mouton.

Dans une autre série d'expériences, nous avons pu mettre en évidence l'existence des récepteurs communs que possèdent les globules rouges de tous les groupes. Pour cela, nous avons immunisé trois lapins respectivement avec des globules du groupe A, du groupe B et du groupe O. Nous nous sommes servi des mêmes globules provenant des mêmes personnes pour effectuer les immuno-réactions d'agglutination et d'hémolyse. Chaque sérum a été mis en contact avec les globules ayant servi d'antigène et avec les globules des autres groupes ; les titres des pouvoirs agglutinants et hémolytiques ont été notés avec soin.

Immuno-sérums	Titre d'agglutination			Titre hémolytique	
	Gl. r. A	B	O	Gl. r. humains	Gl. r. mouton
Anti-A	2.048	64	< 128	< 32	512
Anti-B	64	1.024	< 64	< 16	< 64
Anti-O	256	128	128	< 32	128

Nous constatons sur ce tableau que les titres d'agglutination les plus élevés correspondent, d'une manière générale, aux anticorps spécifiques (ex. sérum anti-A avec gl. r. A) ; l'existence des autres agglu-

tinations répond à l'action des hétéro-anticorps naturels (sérum de lapin).

La seconde partie du tableau met encore en évidence le faible titre hémolytique des sérums anti-homme préparé à partir de globules rouges humains, quel que soit le groupe auquel appartiennent ces globules, et confirme la notion des récepteurs communs aux globules de mouton et aux globules humains, en soulignant que ces récepteurs sont doués d'affinité variable selon les groupes.

Pour expliquer la différence de titre entre les hémolysines anti-homme et anti-mouton, il est nécessaire de supposer que les globules humains renferment moins de récepteurs hémolytiques anti-homme que de récepteurs hémolytiques anti-mouton.

B. — PARALLÉLISME DANS LA DISPARITION PAR ADSORPTION DES DEUX ANTICORPS CONSIDÉRÉS

Après avoir constaté qu'au cours de l'immunisation de nos lapins, les anticorps agglutinants et hémolytiques n'apparaissaient jamais isolément, mais toujours simultanément nous avons cherché, par le procédé de la saturation fractionnée du sérum, s'il était possible de faire disparaître l'un des anticorps à l'exclusion de l'autre.

Dans une première partie, nous avons tenté d'adsorber électivement les agglutinines, et nous avons cherché ce que devenaient les hémolysines pendant

le même temps. Dans une deuxième partie, nous avons effectué l'opération inverse : adsorption élective des hémolysines et étude de l'évolution du pouvoir agglutinant.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Nous avons réalisé l'adsorption des agglutinines en portant pendant 1 heure à la glacière 1 cc. de sérum anti-mouton (préparé au moyen de globules rouges humains du groupe A) Après avoir vérifié que le sérum possédait bien les agglutinines et les hémolysines, il a été dilué au 1/10, inactivé à 56° pendant 30 minutes, et additionné de 0,2 cc. d'une émulsion de globules de mouton à 50 %.

Après centrifugation, le liquide surnageant provoquait encore, quoique plus faiblement, l'agglutination des globules humains ; donc disparition partielle des agglutinines. Par ailleurs, en présence du complément le pouvoir hémolytique de ce même liquide surnageant s'est montré, lui aussi, moins actif, tant avec les globules humains qu'avec ceux de mouton ; le pouvoir hémolytique anti-mouton par exemple, était tombé de 1/4000 à 1/3000. En somme, dès la première adsorption, il apparaît que l'affaiblissement partiel des pouvoirs hémolytique et agglutinant s'opère simultanément, et non pas isolément, comme on pouvait s'y attendre.

Nous réalisons de la même manière une deuxième adsorption à la glacière, en utilisant le sérum anti-

mouton qui a déjà servi à la première adsorption. Après centrifugation, nouvelle recherche de la présence des agglutinines et parallèlement des hémolysines, mettant en évidence un nouvel abaissement du titre des deux anticorps. Cette technique de saturation fractionnée des ambocepteurs a été répétée 5 fois. Après la 5^e fois, l'agglutination était très faible et l'hémolyse nulle.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Elle met en pratique la possibilité inverse. Il s'agit cette fois d'adsorber électivement les hémolysines anti-mouton, tout en suivant le sort des agglutinines.

Nous avons déterminé au préalable la quantité de complément nécessaire et suffisante pour effectuer une hémolyse totale et, partant, une adsorption complète des hémolysines. L'adsorption a été réalisée en portant à l'étuve à 37° pendant 30 minutes un mélange de 0 cc. 5 de sérum anti-mouton (préparé cette fois avec des globules de mouton) en dilution à 1/200, 1 cc. de complément à 1/10 et des globules rouges de mouton jusqu'à l'épuisement complet du sérum. Après avoir vérifié la saturation complète des hémolysines par les globules rouges de mouton, nous avons cherché si ce mélange contient encore des agglutinines, en ayant eu soin préalablement de chauffer à 56 degrés le mélange pour chasser l'excès de complément qui pourrait fausser ici la réaction en introduisant des hétéro-agglutinines.

Toutes les fois que les hémolysines ont été complètement absorbées il a été impossible d'effectuer l'agglutination. Les agglutinines ont donc disparu en même temps que les hémolysines. Cette expérience est encore plus nette si l'on a soin de procéder à la saturation fractionnée des hémolysines avec différentes quantités de globules rouges (0 cc. 2, 0 cc. 5, 1 cc.) et différentes concentrations de ces globules rouges, variant de 20 à 50 % ; on réalise ainsi la disparition simultanée et proportionnelle des deux anticorps.

Adsorption simultanée des anticorps spécifiques et non spécifiques par le même antigène.

Il est curieux de constater que le sérum hémolytique anti-mouton, préparé chez le lapin par des injections de globules rouges humains, est aussi fortement et aussi facilement adsorbé par ces mêmes globules humains que le sérum hémolytique anti-homme lui-même.

C'est ce qui ressort de l'expérience suivante :

Notre technique consistait à porter 1 heure à la glacière une série de tubes à hémolyse, contenant chacun 1 cc. d'une émulsion à 5 % de globules rouges humains du groupe A ou AB et 1 cc. de différentes dilutions de notre sérum anti-mouton.

Après centrifugation des différents mélanges, nous avons recherché s'il restait des hémolysines dans le liquide surnageant, en nous servant pour cela de

globules de mouton. L'hémolyse fut négative partout, sauf dans les tubes de contrôle, indiquant par là que l'adsorption avait été totale. Ainsi les globules des groupes A et AB sont susceptibles d'adsorber non seulement les hémolysines anti-homme (hémolysines spécifiques), mais encore les hémolysines anti-mouton (hémolysines non spécifiques).

Si au lieu de A ou AB on utilise pour l'adsorption des globules B ou O, elle ne se produit pas, et l'on obtient l'hémolyse dans tous les tubes. Au cours de l'adsorption des hémolysines par les globules rouges A, nous avons constaté en même temps la disparition des agglutinines anti-homme et anti-mouton, ce qui confirme la parenté des 2 phénomènes déjà exposée précédemment.

Dans tous ces exemples, l'élimination parallèle des hémolysines et des agglutinines sans qu'il soit possible de les dissocier, plaide en faveur de leur unicité. Ces deux anticorps proviennent, soit d'un seul et même récepteur fixé sur les globules rouges (antigène), soit de deux groupes de récepteurs tellement proches par leur constitution physico-chimique que ceux-ci adsorberaient simultanément les deux amboccepteurs correspondants. Nous ne pouvons dire, à l'heure actuelle, quelle est la composition de cet immuno-anticorps « agglutinine-hémolysine », qui s'individualise en deux fractions différentes, ni sur quelles fractions du sérum sont fixés les supports de ces fonctions. Il ne faut pas oublier que tous les éléments qui participent à la réaction ne le font pas seulement à

titre d'anticorps dans le sens purement sérologique du mot, mais aussi à titre d'agents doués de propriétés physico-chimiques non élucidées.

C. — HYPOTHÈSES EXPLICATIVES POUR L'INTERPRÉTATION DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS DANS CE CHAPITRE

La théorie d'Ehrlich sur les récepteurs communs nous a permis de comprendre l'apparition des anticorps à la fois anti-homme et anti-mouton, et cela aussi bien dans les sérums obtenus avec l'antigène humain (globules rouges) que dans ceux préparés avec l'antigène de mouton (globules rouges). Cependant il n'en reste pas moins un fait troublant : la différence souvent considérable qui existe entre le titre des hémolysines et des agglutinines contenues dans le même immunsérum préparé avec le même antigène.

Nous avons essayé de trouver la solution du problème dans la différence du nombre des globules rouges chez l'homme (5 millions) et chez le mouton (11 millions). Cependant, cette explication ne peut tenir, puisque nous avons eu soin d'utiliser pour nos injections immunisantes, des dilutions de globules contenant à peu près le même nombre de globules dans les deux cas ; les résultats furent identiquement les mêmes.

Une autre interprétation nous a paru devoir retenir notre attention. Nous avons déjà dit que la plus grande

richesse en agglutinines du sérum anti-homme serait due à la plus grande teneur en groupes de récepteurs spécifiques pour l'agglutination des globules rouges humains. Cette agglutination des globules humains étant d'emblée très forte, ceux-ci se collent en amas difficilement attaquables, d'une perméabilité moins grande pour les hémolysines, d'où le faible taux de l'hémolyse par rapport au taux de l'agglutination. Au contraire, dans ce même sérum, les agglutinines anti-mouton étant très faibles, les globules rouges de mouton offrent une plus grande surface à l'action de l'hémolysine anti-mouton, d'où le titre plus élevé constaté.

Mais il est bien entendu qu'il ne s'agit ici que d'une explication partielle, les processus d'hémolyse et d'agglutination sont tellement complexes que leur mécanisme relève certainement de plusieurs influences.

Par ailleurs, dans le cas des immunsérums préparés chez le lapin à partir d'injections de globules humains ou de mouton, il ne faut pas oublier de tenir compte des propriétés naturelles de ce sérum de lapin. Celui-ci contient fréquemment à l'état normal des agglutinines pour les globules humains et des hémolysines pour les globules de mouton. L'inverse n'a jamais été observé. Et l'on sait maintenant qu'un animal susceptible d'avoir des hétéro-anticorps naturels pour un antigène donné élabore des immunsérums d'une haute valeur pour cet antigène.

Mais pourquoi le sérum de lapin contient-il à l'état

normal des agglutinines anti-homme et des hémolysines anti-mouton ? C'est une question qui dépasse de beaucoup les données actuelles de la science, et aucune réponse satisfaisante n'a encore pu être donnée à ce sujet.

CHAPITRE II

Historique de la découverte des isohémolysines et des isoagglutinines.

Définition.

Les isohémolysines et les isoagglutinines sont des ambocepteurs existant à l'état naturel dans le sérum, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer une immunisation préalable comme pour l'obtention des hétéro-anticorps, et doués de propriétés sérologiques pour les globules rouges d'un animal de même espèce que celui qui a fourni le sérum contenant ces isoanticorps.

Historique.

Il n'y a pas de question qui ait été plus controversée que celle de la présence des isohémolysines, comme d'ailleurs des isoagglutinines, dans le sang d'un sujet, et surtout d'un sujet sain. En effet, les nombreux auteurs qui se sont attachés à cette question représentaient deux opinions différentes : ceux qui n'admettaient la présence de ces isoanticorps que comme une manifestation pathologique, signe révélé-

lateur de quelque maladie latente, et ceux qui se sont au contraire appliqués à montrer qu'il s'agissait là d'une particularité purement physiologique et quasi constante du sérum des sujets sains. Le premier groupe d'auteurs a été de beaucoup le plus important, et pendant un certain temps, on a voulu utiliser la recherche des isohémolysines comme moyen de dépistage de certaines affections, surtout le cancer et la tuberculose.

Bien avant les célèbres recherches de Bordet, Ehrlich et Landsteiner, le fait que le sérum de certains sujets agglutine et hémolyse les globules rouges d'autres sujets de même espèce était connu. C'est ainsi que Creite, dès 1869, signalait la présence d'agglutinines normales dans le sang. En 1892, Maragliano fut le premier à démontrer que le sérum humain, dans certains cas de chlorose, possédait la propriété de lyser les globules d'autres personnes ; mais sa découverte tomba bientôt dans l'oubli. Cependant, en 1900, Donath signale à nouveau cette propriété hémolytique dans la chlorose, Le Monaco et Panichi dans la malaria.

Un an plus tard, Jean Camus et Pagniez montrent que le sérum de certains tuberculeux agglutine les hématies humaines. La même année, Ascoli constate la présence d'isohémolysines chez deux personnes atteintes de fièvre typhoïde, mais n'en constate pas chez les sujets sains. Puis la question des hémolysines subit une éclipse jusqu'en 1908, époque à laquelle plusieurs travaux sont publiés, mais toujours en rela-

tion avec des cas pathologiques. Crile les observe surtout dans le cancer et la tuberculose. Richartz, en 1909, les met en évidence 34 fois sur 76 cas de tumeurs malignes, mais ne les retrouve pas chez 112 sujets sains examinés à ce propos. En même temps, Keling, qui découvre dans le sérum humain des hémolysines pour les globules rouges de poule, prétend que ces hémolysines existent surtout chez les cancéreux, les tuberculeux, dans l'anémie pernicieuse et la leucémie, tandis que Janeway établit qu'absence d'hémolyse signifie absence de tumeur maligne, et qu'à l'inverse, la réaction positive plaide en faveur d'un cancer ou d'une tuberculose. D'autres auteurs confirment cette opinion ; ce sont Blumgarten, Johnstone et Canning.

Alessandri, en 1910, indique que les hémolysines disparaissent après ablation de la tumeur, pour reparaître lors d'une récurrence. Un peu plus tard, en 1913, Dufour écrit dans sa thèse de Médecine : « Les isolysines et les autolysines ne se trouvent que chez l'individu pathologique. Elles se rencontrent dans les infections aiguës avec une assez grande fréquence. Cependant c'est encore dans la syphilis, la tuberculose et le cancer qu'on avait le plus de chance de les trouver ».

Citons encore, à la même période ce passage d'Ottenberg et Kaliski : « L'hémolyse du sang d'une personne par le sang d'une autre personne est un phénomène pathologique. Autrefois on pensait que l'hémolyse était caractéristique du cancer et de la

tuberculose, mais on a montré depuis qu'on peut la mettre en évidence dans d'autres maladies ».

En somme, tous ces auteurs et d'autres encore sont d'accord pour considérer la présence des isohémolysines dans le sang comme une manifestation d'ordre pathologique. L'isohémoagglutination a soulevé les mêmes discussions.

C'est le grand mérite de Landsteiner d'avoir montré, dans les travaux qu'il publia à partir de 1900, que le phénomène d'isohémoagglutination n'est pas, comme on le pensait auparavant, un phénomène pathologique, mais bien au contraire, une réaction purement physiologique, résultant d'un caractère constitutionnel de l'individu, qui permet de classer les êtres humains en différents groupes sanguins ou types. La priorité de la découverte des isoagglutinines et, en général des iso anticorps, appartient sans conteste à Landsteiner, puisque, le 23 mars 1900, il fit paraître dans le *Centralblatt für Bakteriologie* une communication dans laquelle il affirmait notamment que « le sérum des personnes saines agglutine non seulement les globules rouges des animaux, mais aussi ceux d'autres personnes. » Et, avant 1905, Landsteiner en collaboration avec Leiner mentionnait que ni l'hémolyse, ni l'agglutination ne peuvent servir pour le diagnostic différentiel entre sujets sains et sujets malades. Ils ne font état que d'un cas, où l'isohémolyse revêt une signification pathologique, c'est dans l'hémoglobulinurie paroxystique.

Il faut tout de même faire ici une place aux pré-

tion avec des cas pathologiques. Crile les observe surtout dans le cancer et la tuberculose. Richartz, en 1909, les met en évidence 34 fois sur 76 cas de tumeurs malignes, mais ne les retrouve pas chez 112 sujets sains examinés à ce propos. En même temps, Keling, qui découvre dans le sérum humain des hémolysines pour les globules rouges de poule, prétend que ces hémolysines existent surtout chez les cancéreux, les tuberculeux, dans l'anémie pernicieuse et la leucémie, tandis que Janeway établit qu'absence d'hémolyse signifie absence de tumeur maligne, et qu'à l'inverse, la réaction positive plaide en faveur d'un cancer ou d'une tuberculose. D'autres auteurs confirment cette opinion ; ce sont Blumgarten, Johnstone et Canning.

Alessandri, en 1910, indique que les hémolysines disparaissent après ablation de la tumeur, pour réparaître lors d'une récurrence. Un peu plus tard, en 1913, Dufour écrit dans sa thèse de Médecine : « Les isolysines et les autolysines ne se trouvent que chez l'individu pathologique. Elles se rencontrent dans les infections aiguës avec une assez grande fréquence. Cependant c'est encore dans la syphilis, la tuberculose et le cancer qu'on avait le plus de chance de les trouver ».

Citons encore, à la même période ce passage d'Ottenberg et Kaliski : « L'hémolyse du sang d'une personne par le sang d'une autre personne est un phénomène pathologique. Autrefois on pensait que l'hémolyse était caractéristique du cancer et de la

tuberculose, mais on a montré depuis qu'on peut la mettre en évidence dans d'autres maladies ».

En somme, tous ces auteurs et d'autres encore sont d'accord pour considérer la présence des isohémoly-sines dans le sang comme une manifestation d'ordre pathologique. L'isohémoagglutination a soulevé les mêmes discussions.

C'est le grand mérite de Landsteiner d'avoir montré, dans les travaux qu'il publia à partir de 1900, que le phénomène d'isohémoagglutination n'est pas, comme on le pensait auparavant, un phénomène pathologique, mais bien au contraire, une réaction purement physiologique, résultant d'un caractère constitutionnel de l'individu, qui permet de classer les êtres humains en différents groupes sanguins ou types. La priorité de la découverte des isoagglutinines et, en général des iso anticorps, appartient sans conteste à Landsteiner, puisque, le 23 mars 1900, il fit paraître dans le *Centralblatt für Bakteriologie* une communication dans laquelle il affirmait notamment que « le sérum des personnes saines agglutine non seulement les globules rouges des animaux, mais aussi ceux d'autres personnes. » Et, avant 1905, Landsteiner en collaboration avec Leiner mentionnait que ni l'hémolyse, ni l'agglutination ne peuvent servir pour le diagnostic différentiel entre sujets sains et sujets malades. Ils ne font état que d'un cas, où l'isohémolyse revêt une signification pathologique, c'est dans l'hémoglobinurie paroxystique.

Il faut tout de même faire ici une place aux pré-

curseurs de Landsteiner, dont les travaux ont permis d'amener la question des isoanticorps à son point de développement actuel.

Ce sont d'abord, en 1895, les remarquables travaux de J. Bordet sur les hétéro-anticorps chez les animaux, et surtout ceux d'Ehrlich et Morgenroth, en particulier un article intitulé « Ueber Haemolysine », paru en 1900, dans la *Berliner med. Wochenschrift*, et qui relatait que, par des injections à certaines chèvres du sang d'autres chèvres, ils avaient pu obtenir des hémolysines actives sur des globules rouges homologues (isohémolysines artificielles). Par la suite des expériences analogues furent pratiquées sur le lapin (Ascoli et Schulz), sur le poulet (Hadda et Rosenthal), le bœuf (Todd), le chien (Dungern et Hirszfeld).

Puis, petit à petit, plusieurs auteurs ont fait définitivement le procès du caractère pathologique conféré à la présence des isoanticorps dans le sang. Moss, examinant en 1910, un grand nombre d'individus, a retrouvé les isohémolysines et les isoagglutinines avec la même fréquence chez les sujets sains et chez les sujets malades. « L'isoagglutination apparaît indépendamment de l'isohémolyse, tandis que celle-ci est, dit-il, presque toujours accompagnée par l'isoagglutination ». 90 % des sérums humains examinés par lui contenaient les isoagglutinines et 25 % seulement les isolysines.

Quant à Grafe et Graham en 1911, ils ont non seulement confirmé qu'il s'agissait bien d'un phénomène purement physiologique, mais ils ont eu le

mérite de montrer le rapport existant entre isoagglutination et isohémolyse, qui ne sont que les deux différents aspects d'un même phénomène, et ils sont arrivés aux conclusions suivantes : « Dans tous les cas étudiés, nous avons constaté qu'il s'agit de deux ambocepteurs différents dans le sérum et de deux récepteurs correspondants dans les globules rouges ». Ils ont également observé que les isolysines étaient toujours accompagnées par les isoagglutinines. 30 % de leurs sérums étaient hémolytiques. Un pourcentage sensiblement égal (27,8 %) a été donné par Jervel en 1921. En 1921 également, Behne et Lieber faisaient remarquer que l'hémolyse apparaissait dans le cas où le titre de l'agglutination est élevé.

En résumé, d'après le témoignage de tous ces auteurs, la présence des isolysines et isoagglutinines dans le sérum et des récepteurs correspondants dans les globules rouges est une propriété structurale du sang normal.

Il existe un parallélisme complet entre les deux réactions qui ne sont que les deux aspects d'un même phénomène, mais les globules rouges humains étant relativement plus résistants à l'hémolyse qu'à l'agglutination, les isohémolysines existent souvent dans le sérum à l'état latent, mais demandent certaines conditions pour révéler leur présence. Il s'agit de déterminer quelle proportion de sérum doit être mise en contact avec les globules pour déterminer soit l'hémolyse, soit l'agglutination, et il apparaît qu'il faut relativement une plus grande quantité d'hémolysine

pour provoquer la lyse des globules humains que d'agglutinine pour déclencher l'agglutination.

On se rappelle que l'immunsérum spécifique anti-homme remis en contact avec les globules humains les agglutinait fortement, à l'exclusion de toute autre réaction ; cependant, dans ce sérum, les hémolysines existaient, mais leur titre était faible. Nous pensons qu'il faut avoir cet exemple présent à l'esprit lorsque nous considérons, non plus les immuno-anticorps, mais les isoanticorps naturels qui, comme les précédents, révéleront leur présence en premier lieu par l'agglutination.

CHAPITRE III

Mise en évidence des isohémolysines dans les sérums normaux.

De même que les hétérolysines et les hétéroagglutinines apparaissent toujours simultanément dans l'immunsérum de lapin, de même les isolysines et les isoagglutinines existent conjointement et jamais isolément dans le sérum humain normal. Mais la mise en évidence des hémolysines est souvent très délicate, tandis que celle des agglutinines est facile. C'est pourquoi, avant de montrer les liens qui unissent ces deux anticorps, nous avons voulu exposer dans ce chapitre tous les moyens susceptibles d'augmenter l'affinité de l'iso-ambocepteur hémolytique spécifique, existant à l'état normal dans le sérum, pour le récepteur correspondant dans les globules homologues. Nous pourrions ainsi extérioriser aisément le phénomène d'hémolyse qui existe souvent à l'état latent.

Nous avons donc été amenée à faire varier plusieurs conditions dans les expériences. Nos efforts ont

d'abord porté *sur les globules rouges*, dont la résistance a été diminuée :

a) par le vieillissement (conservation plusieurs jours) ;

b) par le chauffage,

et ensuite *sur le sérum*, qui a subi les traitements suivants :

1° Une série de réactions a été effectuée avec le sérum frais non chauffé et employé à des dilutions minimales, pour ne pas trop affaiblir le complément ;

2° Dans une deuxième série, le sérum a été chauffé 30 minutes à 56°, et l'on a ajouté le complément (sérum frais de cobaye) ;

3° Enfin, dans une dernière catégorie d'expériences, nous avons eu recours au sérum purifié par adsorption au moyen des agglutinogènes correspondants (A ou B), suivie de dissociation des isoanticorps, qui sont dès lors à l'état pur.

Groupes sanguins. Lois régissant l'agglutination chez l'homme.

Avant de poursuivre plus avant la partie expérimentale de ce chapitre, ouvrons une parenthèse pour rappeler au lecteur les données les plus essentielles concernant la classification des êtres humains en 4 groupes sanguins déterminés au moyen des réactions d'isoagglutination, car nous ferons souvent

allusion, dans la suite, aux lois qui régissent les phénomènes d'agglutination chez l'homme.

Il existe 4 groupes sanguins, qui ont reçu la notation suivante : A, B, AB et O. Les hématies doivent être considérées comme des antigènes possédant des récepteurs porteurs de propriétés agglutinantes (agglutinogènes) A et B. Ces propriétés sont des « gènes » indépendants et héréditaires. Les facteurs A et B peuvent se trouver séparément dans les hématies, ou ensemble, constituant le groupe AB, ou manquer complètement : il s'agit alors du groupe O.

A ces globules rouges correspondent des sérums propres qui doivent être considérés comme des anticorps renfermant un ambocepteur spécifique, ou agglutinine.

Aux globules rouges A correspond le sérum anti-A ou β .

Aux globules rouges B correspond le sérum anti-B ou α .

Les agglutinines anti-A et anti B sont développées réciproquement par rapport aux récepteurs des globules rouges.

Le sang O, qui renferme des hématies ne contenant pas les récepteurs A et B, possède au contraire, dans son sérum, les deux agglutinines correspondant à ces récepteurs, soit α et β . Enfin, les hématies AB, qui contiennent à la fois les deux agglutinogènes, vont de pair avec un sérum qui ne renferme pas d'agglutinine : c'est le sérum o, d'où les 4 combinaisons

physiologiques normales : $A\beta$, $B\alpha$, $AB\alpha$, $O\alpha\beta$. A l'état normal, un même sang ne possède pas d'agglutinine contre ses propres hématies, mais seulement contre des hématies étrangères, d'où les formules qui régissent l'agglutination : $A\alpha$, $B\beta$, $AB\alpha$ ou β .

Les groupes A et B s'agglutinent réciproquement. Les globules rouges AB sont agglutinés par le sérum de tous les groupes sauf le sien. Les globules rouges O ne sont agglutinés par aucun sérum, mais le sérum de ce groupe ($\alpha\beta$) agglutine les globules des trois autres groupes.

On n'a pas encore résolu le problème concernant l'existence de gènes spéciaux pour le développement des agglutinines et des hémolysines. Certains auteurs, tels que Bernstein, Lauer, Morville, Friedenreich, Thomsen, et d'autres, supposent que les agglutinines α et β existent à l'origine chez tous les sujets, mais, lors de l'apparition des agglutinogènes contenus dans les globules rouges, ceux-ci absorbent l'anticorps-agglutinine correspondant : α pour A, β pour B, $\alpha\beta$ pour AB. Par conséquent, l'anticorps qui n'est pas fixé par l'agglutinogène reste libre, et c'est lui seulement que l'on peut dépister dans le sérum.

Augmentation du titre hémolytique par l'emploi de globules rouges conservés.

L'on sait que des globules rouges, quels qu'ils soient, perdent leur résistance naturelle aux anti-

corps spécifiques s'ils sont vieux de plusieurs jours. Cette modification sérologique est bien connue lorsqu'on travaille avec le sérum hémolytique anti-mouton : le titre de ce sérum augmente en proportion de l'âge des globules avec lesquels on pratique la réaction : globules conservés 1 jour, 2 jours, 3 jours, etc.

L'action des hémolysines humaines sur les globules humains d'âge différent est en tous points semblable. Dans ces conditions, nous avons expérimenté de manière à comparer les titres lytiques obtenus suivant l'âge des globules employés, et nous nous sommes efforcée de réunir les résultats dans un tableau comparatif.

Nous avons opéré de la façon suivante :

Les globules humains n'ont été lavés que deux fois, pour ne pas risquer d'affaiblir les récepteurs hémolytiques. Lors de la centrifugation au cours de ces lavages, nous nous sommes appliquée à ne pas détruire mécaniquement les globules en ne dépassant pas 2 à 3.000 tours. Les globules ainsi préparés ont été répartis en 5 portions : la réaction d'hémolyse a été effectuée successivement avec des globules frais, puis de 1 jour, 2 jours, etc. Les derniers lots de globules étaient conservés à la glacière pour retarder l'apparition de l'hémolyse spontanée. Le sérum a été obtenu stérilement par ponction veineuse et centrifugation pour le séparer des globules. Après avoir chauffé ce sérum à 56° pendant 30 minutes, nous avons utilisé 0 cc. 5 de dilutions progressivement croissantes. Pour obtenir l'hémolyse, il a fallu ajouter 0 cc. 5 de com-

plément au 1/10 et 0 cc. 5 de globules rouges humains à 2,5 %. Nous avons complété à 2 cc. avec de l'eau physiologique. Nos expériences effectuées parallèlement au bain-marie à 37° ou à l'étuve, ont donné le même résultat. La lecture, faite après 30 minutes, a permis d'établir le tableau suivant :

Sérum anti-A ou α	Globules rouges. A de :				
	Frais	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours
1/2	H. c.	H. c.	H. c.	H. c.	H. c.
1/4	H. c.	H. c.	H. c.	H. c.	H. c.
1/8	H. p.	H. c.	H. c.	H. c.	H. c.
1/16	H. 0	H. p.	H. c.	H. c.	H. c.
1/32	H. 0	H. p.	H. c.	H. c.	H. c.
1/64	H. 0	H. 0	H. 0	H. c.	H. c.
1/128	H. 0	H. 0	H. 0	H. 0	H. p.
1/256	H. 0	H. 0	H. 0	H. 0	H. 0

H. c. = hémolyse complète.

H. p. = hémolyse partielle.

H. 0 = pas d'hémolyse.

On constate sur ce tableau que le titre du sérum hémolytique est d'autant plus élevé qu'on emploie des globules plus âgés pour effectuer la réaction. Les globules frais se montrent, au contraire, particulièrement résistants. Il est aisé de voir le titre hémolytique, qui est de 1/8 avec ceux-ci, passer à 1/32 avec des globules de 2 jours, à 1/64 avec des globules de 3 jours, etc. A partir du 4^e jour, l'hémolyse spontanée partielle qui se produit est trop insignifiante pour influencer sérieusement les résultats, cependant on n'a pas utilisé des globules plus âgés à cause de l'hémolyse spontanée. L'emploi de globules conser-

vés permet donc de mettre en évidence les hémoly-sines latentes.

**Sensibilisation de la réaction d'hémolyse
par action de la chaleur
sur les globules rouges frais.**

Après le vieillissement par conservation, le chauffage paraît être le meilleur moyen pour diminuer la résistance des globules à l'action des sérums hémolytiques.

Hesser a fait agir ces sérums sur des globules chauffés 5, 10, 15 minutes et jusqu'à 1 heure et à des températures croissantes. Le sérum dont le pouvoir hémolytique était souvent trop faible pour agir sur des globules frais A, B ou AB était capable de provoquer l'hémolyse partielle de ces mêmes globules lorsque ceux-ci avaient été chauffés au voisinage de 45°. A 55° même après 5 minutes de chauffage une hémolyse spontanée partielle se produisait il suffisait alors d'éliminer le liquide rosâtre surnageant après centrifugation et d'opérer le lavage de la purée globulaire restante pour obtenir désormais une hémolyse et une agglutination de ces globules par le sérum, l'hémolyse se révélait même particulièrement forte.

Le titre hémolytique d'un sérum semble donc pouvoir être augmenté par des temps de chauffage progressivement croissants, de ces globules rouges.

Dans les deux procédés de vieillissement et de chauffage, la membrane des globules est attaquée, permettant ainsi une diffusion plus facile de l'hémo-

globine, ce qui ne peut se produire lorsque le globule frais présente une membrane plus résistante. A cette première attaque, s'ajoute l'action du sérum hémolytique correspondant au groupe des globules mis en présence. Car il ne s'agit bien, en effet, que d'une diffusion de l'hémoglobine dans tous ces phénomènes d'hémolyse, et non d'une destruction vraie du globule. Cette opinion est confirmée par Much dans son livre intitulé : *Pathologie biologique*. Il y est dit notamment que « prise dans son sens le plus étroit, l'expression lyse n'est pas exacte : il ne s'agit pas ici d'une destruction des cellules ».

**Modification des conditions d'expériences,
portant sur le facteur : sérum.**

a) Dans un deuxième temps, nous avons fait varier d'autres facteurs dans nos expériences. Ces modifications ont porté en particulier sur le sérum. Nous avons effectué la réaction tant avec le sérum frais actif, sans préparation, qu'avec du sérum inactivé à 56° pendant 30 minutes, auquel on ajoutait du complément étranger. La comparaison des résultats obtenus par ces deux procédés n'a fait ressortir qu'une très faible oscillation du pouvoir hémolytique.

Par ailleurs, il nous a paru intéressant d'étudier l'action de ces deux sérums : frais et inactivé, sur des globules d'âge différent, en évitant toutefois d'utiliser les globules de 4 jours, pour ne pas être gêné par l'hémolyse spontanée qui se produit souvent à cette

date. Nous avons parallèlement recherché l'agglutination.

Sérum anti-A ou α	Hématies de :				
	fraîches	1 jour	2 jours	3 jours	
Actif	+	++	+++	++++	Hémolyse
Inactivé	0	0	0	0	
Actif	+	+	+	+	Agglutination
Inactivé	+	+	+	+	

Nous voyons que l'agglutination se produit dans les deux cas, aussi bien avec le sérum inactivé qu'avec le frais. Par contre, l'hémolyse ne se produit qu'avec le sérum frais et est d'autant plus intense que les globules en présence sont plus vieux. Il a été possible de faire réapparaître l'hémolyse dans le cas du sérum inactivé par simple adjonction de complément (sérum de cobaye). Le complément étant thermolabile, lui seul est détruit par le chauffage. Nous avons répété la même expérience avec le sérum β et les globules B, α , β et les globules A, B ou AB. Les résultats ont été identiques, sauf pour le sérum du groupe AB, qui ne donne jamais ni hémolyse, ni agglutination.

b) Nous avons ensuite utilisé pour nos hémolyses le sérum purifié par adsorption et dissociation au moyen de la méthode préconisée par Dujarric de la Rivière et Kossovitch dans leur ouvrage sur les « Groupes sanguins ».

A 5 cc. de sérum d'un titre élevé, on ajoute les hématies lavées du groupe A pour le sérum α , B pour le sérum β . Le mélange est laissé 2 heures à la température du laboratoire, ou mieux 1 heure à la glacière. Après ce temps, le liquide surnageant est éliminé et les globules lavés à l'eau physiologique glaciale pour faire disparaître toute trace d'agglutinines et d'hémolysines non adsorbées. Il ne nous reste que des globules ayant adsorbé les isoanticorps seuls. Pour effectuer la dissociation, on ajoute 0 cc. 5 d'eau physiologique chaude et l'on porte aussitôt au bain-marie à 55° pendant 5 minutes, en mélangeant constamment. Après quoi on centrifuge à chaud à 55°. Le liquide surnageant contient alors les agglutinines spécifiques, libérées à l'état pur, c'est-à-dire débarrassées de toutes les substances qui sont inutiles à la réaction. Cependant, ce sérum n'a donné un titre hémolytique que faiblement supérieur à celui du sérum sans préparation.

c) Hesser et Moreschi ont beaucoup étudié l'action isohémolytique des sérums chauffés à différentes températures, procédé identique à celui du chauffage des globules précédemment étudié.

Hesser aurait constaté que le chauffage des sérums à 45° pendant 30 minutes empêche l'hémolyse des globules frais, mais laisse subsister une hémolyse faible pour les globules d'un jour, plus forte pour ceux de deux jours et intense pour ceux de trois jours. A 50°, il y aurait destruction complète du pouvoir hé-

molytique. Moreschi confirme cette opinion, en prétendant que les isohémolysines naturelles du sérum humain deviennent inactives entre 45° et 48°. Hesser va plus loin encore : pour lui, il est impossible de réactiver un sérum chauffé à 50° pendant 30 minutes, et il conclut en ces termes : « Ceci montre que l'embocpteur normal est relativement thermo-labile et peut à peine être différencié du complément par le chauffage ». Et plus loin : « Chauffer une demi-heure à 56° rendait le sérum complètement inactif, et complément aussi bien qu'ambocepteur étaient détruits ».

Cependant, dans presque tous les cas, nous avons pu réactiver le sérum chauffé à 55° pendant 15 à 20' par simple adjonction de sérum frais de cobaye, après avoir vérifié l'existence possible d'un pouvoir anti-hémolytique chez ce dernier. Le sérum purifié par adsorption a, lui aussi, perdu son pouvoir hémolytique après chauffage à 55° pendant 30 minutes, mais il a été aussi facile de le faire réapparaître par adjonction de sérum de cobaye.

Nous basant sur ces faits, il nous est permis de considérer l'ambocepteur, vecteur des anticorps spécifiques, comme thermo-stable ; le complément seul est détruit par le chauffage.

Hesser a en outre montré que l'action isolytique du sérum chauffé à 50° diminue. Le même sérum qui à l'état frais, était capable d'hémolyser les globules de moins d'un jour, perd cette propriété si on le chauffe à 50° pendant 5 minutes, mais conserve

la possibilité d'hémolyser ceux de 2 à 3 jours. Par conséquent, le pouvoir hémolytique n'était pas détruit, mais seulement affaibli, et l'emploi de globules moins résistants permet d'extérioriser plus aisément ce pouvoir diminué. La prolongation du chauffage continue d'affaiblir progressivement le pouvoir hémolytique : après 25 minutes, il ne reste plus de trace des hémolysines naturelles. D'après Hesser, la réactivation augmente sensiblement le pouvoir hémolytique du sérum chauffé entre 0 et 25 minutes ; l'hémolyse est surtout intense pour les globules de 3 jours.

Anti-hémolysine du sérum humain normal.

Nous n'avions pas encore mentionné la présence possible de ces anti-hémolysines. Elles existent dans le sérum normal. Grafe et Graham ont particulièrement bien étudié cette question ; citons ce passage des deux auteurs :

« Dans tous les phénomènes d'inhibition, une anti-hémolysine spécifique, qui a les caractères d'un ambocepteur, joue un rôle important. Cette anti-hémolysine (anti-iso-ambocepteur) se trouve presque régulièrement dans les sérums humains dont les globules rouges possèdent les récepteurs correspondants pour cette isolysine. »

C'est à la présence de ces anti-hémolysines que ces auteurs attribuent les quelques échecs de réactivation de sérum lorsqu'on a utilisé le sérum humain comme complément.

Proportionnalité du pouvoir hémolytique et du pouvoir agglutinant.

Poursuivant l'étude des propriétés optima des sérums dans le phénomène d'iso-hémolyse, nous avons pu établir dans une longue série d'expériences qu'en dehors de toutes préparations spéciales infligées aux sérums actifs isolytiques, ceux-ci sont à l'état normal d'autant plus hémolytiques que leur pouvoir agglutinant est plus élevé. Le tableau suivant rend compte de cette proportionnalité :

Sérum hémolysant anti-A	Hémolyse des globules A de :				
	Frais	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours
1 : 256	H. +	H. ++	H. +++	+++	++++
128	+	++	+++	+++	++++
64	+	+	++	++	+++
32	H. 0	0	+	+	++
16	0	0	0	0	+
4	0	0	0	0	0
Témoins	Sérum anti-B	0	0	0	0
	Eau φ	0	0	0	0

Le sérum qui a le pouvoir agglutinant le plus élevé est aussi celui qui peut hémolyser des globules frais, tandis qu'un sérum dont le pouvoir agglutinant n'est que de 1/32 ne peut hémolyser parallèlement que des globules de 2 jours, etc.

Il est intéressant d'ouvrir une parenthèse pour comparer ces résultats avec ceux de Lilly Sandström, qui a beaucoup étudié les modifications du pouvoir

iso-agglutinant avec l'âge des globules rouges conservés par différents procédés. Avec les globules de 1 jour ou 2, le pouvoir agglutinant reste le même. Il commence à tomber lorsqu'on utilise des globules de 3 jours, mais en conservant ces globules dans une solution de formol à 1 %, l'abaissement du titre n'a plus lieu que pour des globules de 10 ou 12 jours.

En résumé, c'est sur les globules rouges qu'il faut agir pour favoriser l'apparition de l'isohémolyse, par la conservation ou le chauffage de ces derniers. Toutes les modifications qui ont porté uniquement sur le sérum ne nous ont pas donné les résultats espérés quant au renforcement du pouvoir hémolytique ; le chauffage, bien au contraire, n'a fait qu'entraîner une diminution de ce pouvoir. La seule considération susceptible de nous guider dans le choix du sérum est la force de son pouvoir agglutinant, puisqu'il y a proportionnalité entre les deux.

Application de ces notions théoriques à l'étude de la transfusion sanguine.

Nous avons vu que, du moment où l'on constate la présence des isoagglutinines par l'agglutination, les isohémolysines existent conjointement ; seules certaines conditions les empêchent parfois de se révéler en même temps. En d'autres termes, l'hémolyse est toujours précédée par l'agglutination. C'est en se basant sur ce fait que Jervell préconise de pratiquer d'abord et uniquement la réaction d'agglutination

pour savoir si un sujet peut servir de donneur dans une transfusion. Dans le cas où le sang du receveur agglutine les globules rouges du donneur, on court le risque d'avoir en même temps des accidents d'hémolyse.

Jervell, qui a longuement étudié l'action des iso-anticorps dans la transfusion, a constaté maintes et maintes fois qu'en transfusant des sujets du groupe A, B ou AB avec le sang d'un donneur universel (o) dont le sérum ($\alpha\beta$) est hémolysant pour ces trois groupes, il ne se produisait cependant jamais d'accidents d'hémolyse brutale. Jewell interprète ce phénomène un peu paradoxal en considérant à la base la grande dilution des hémolysines du donneur par le sang du receveur. Par ailleurs, Jervell invoque aussi la présence des anti-hémolysines dont nous avons déjà parlé plus haut pour expliquer l'absence d'accidents de cet ordre. Il faut citer, à ce propos, le passage suivant de son œuvre : « Il faut prendre en considération un facteur important, à savoir : que le sérum d'un sujet inhibe l'hémolyse de ses propres globules rouges. Ce phénomène est dû aux anti-hémolysines, qui, comme on le sait, existent normalement dans le sérum humain et peuvent, à une concentration voulue, empêcher complètement l'hémolyse ».

Nous avons vérifié nous-même *in vitro* l'action des anti-hémolysines et la loi qui régit les rapports quantitatifs nécessaires entre sang du donneur et sang du receveur pour éviter tout accident.

1^o Dans une première expérience, effectuée avec du sérum frais, on prend une série de tubes à hémolyse. Dans le tube n^o 1 on met 0 cc. 2 de globules rouges lavés A + 0 cc. 2 de sérum $\alpha\beta$ (du groupe 0), qui est normalement hémolysant pour les globules A. Dans tous les autres tubes on met également 0 cc. 2 de globules A lavés, mais on ajoute deux gouttes de sérum β (correspondant au groupe A), et enfin des doses croissantes : 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3, etc. de sérum $\alpha\beta$. On mélange bien et l'on porte ces tubes à l'étuve à 37° pendant 30 minutes. On constate alors, après ce temps, que seul le tube n^o 1 présente une hémolyse, tandis que dans tous ceux où l'on a ajouté deux gouttes de sérum β l'hémolyse est très sensiblement inhibée, aussi bien avec des globules rouges frais, qu'avec des globules de plusieurs jours.

Par conséquent, l'addition du sérum humain frais *in vitro* (sérum qui n'hémolyse pas et n'agglutine pas les globules rouges à examiner) préserve les hématies de l'hémolyse, et ce phénomène est dû à la présence des anti-hémolysines spécifiques dans le sérum humain normal.

Le tableau suivant que nous empruntons au travail de Grafe et Graham montre bien ce phénomène d'inhibition de l'hémolyse par la présence de sérum correspondant au groupe des globules rouges. Nous présentons la réaction d'hémolyse normale entre globules rouges et sérum iso-hémolytique et en regard la réaction d'inhibition dans laquelle le mélange a été additionné de sérum correspondant.

	Résultat
0,3 cc. de sérum du groupe O	} H +
+ 0,3 cc. d'eau physiologique.....	
+ 0,3 cc. de globules rouges A	
0,3 cc. de sérum du groupe O	} H +
+ 0,3 cc. d'eau physiologique.....	
+ 0,3 cc. de globules rouges B.....	
0,3 cc. de sérum du groupe O	} H +
+ 0,3 cc. d'eau physiologique.....	
+ 0,3 cc. de globules rouges AB.....	
0,3 cc. de sérum O	} H. 0
+ 0,3 cc. de sérum du groupe A	
+ 0,3 cc. de globules rouges A	
0,3 cc. de sérum O	} H. 0
+ 0,3 cc. de sérum du groupe B	
+ 0,3 cc. de globules rouges B	
0,3 cc. de sérum C.....	} H. 0
+ 0,3 cc. de sérum du groupe AB	
+ 0,3 cc. de globules rouges AB	

Il est possible que ces substances jouent un grand rôle dans l'organisme en empêchant la lyse des globules rouges lorsque les hémolysines existent dans le sang. Ces anti-iso-ambocepteurs, où substances anti-complémentaires se forment naturellement dans l'organisme comme les iso-agglutinines et isohémolysines, elles représentent des substances protectrices. Leur présence dans le sang suffit à expliquer pourquoi les isolysines introduites en certaine quantité chez un sujet au cours d'une transfusion demeure sans action lytique sur les globules rouges alors que les mêmes substances sont actives *in vivo*.

2^o La seconde expérience réalisée par nous visait à reproduire *in vitro* d'une façon aussi exacte que pos-

sible ce qui se passe dans l'organisme lors d'une transfusion.

Nous supposons notre receveur du groupe A et notre donneur du groupe O (donneur universel). Il faut se rappeler que le sérum du donneur agglutine et hémolyse les globules du receveur A, tandis que le sérum du receveur ne peut ni agglutiner, ni hémolyser les globules de notre donneur.

Dans une série de tubes à hémolyse, on verse 0 cc. 5 de sang frais défibriné du receveur. Dans chaque tube, on ajoute ensuite des quantités croissantes : 0,1, 0,2, 0,3, etc., de sang du donneur également défibriné ; on mélange bien et on porte à l'étuve à 37° pendant 1 heure ; après quoi on lit les résultats.

Il apparaît que le sang du donneur, dans la proportion de 0 cc. 1 à 0 cc. 5 ne provoque ni l'agglutination, ni l'hémolyse des globules du receveur, ou en quantité infime. Pour les toutes petites quantités ; 0,1 ou 0,2, on peut invoquer la dilution suffisante du sérum du donneur par le sang du receveur, mais pour 0 cc. 4 ou 0 cc. 5 la quantité de sang en présence étant à peu près égale, il faut invoquer l'existence en assez grande quantité des anti-hémolysines dans le mélange.

Si maintenant l'on effectue la même expérience en inversant les quantités respectives du sang du donneur et du receveur : 0 cc. 1 de sang du receveur pour 0 cc. 5 de sang du donneur par exemple, on observe cette fois nettement l'agglutination et l'hémolyse.

CHAPITRE IV

Rapports entre les isolysines et les isoagglutinines dans le sérum humain.

Au début de ce travail nous avons rappelé les liens très étroits qui unissent certaines catégories d'anticorps, tels que les hétéro-lysines et les hétéro-agglutinines. Dans ce dernier chapitre, nous allons montrer que les mêmes liens existent entre les isolysines et les isoagglutinines humaines. Nous mentionnerons les quelques points qui permettent de les différencier, en insistant cependant sur ce qu'elles ont de commun, sur les rapports intimes qui permettent peut-être d'envisager l'hypothèse d'un seul et même anticorps s'extériorisant de façons différentes sous des conditions variables.

La meilleure preuve de l'étroite parenté des deux iso-anticorps est donnée par la constatation de l'existence toujours simultanée de l'agglutinine et de l'isolysine dans un sérum.

Ou bien le sérum ne renferme ni l'une, ni l'autre — il est alors complètement dépourvu d'anticorps —

ou bien si l'on décèle dans le sérum l'un des deux, l'autre existe forcément, qu'il se manifeste spontanément ou non. Il est certain que quelques sérums n'extériorisent que leur pouvoir agglutinant (surtout dans le cas où l'on a utilisé des globules rouges frais) ; par contre on n'a jamais vu de sérum possédant le pouvoir lytique sans le pouvoir agglutinant. Il ne faut pas en déduire que les agglutinines sont plus communément répandues que les hémolysines ; leur fréquence respective est la même, mais nous avons déjà dit qu'elles existent souvent à l'état latent et qu'il faut certaines précautions pour pouvoir les dépister. L'hémolyse et l'agglutination ne pouvant exister dans un sérum isolément, d'une manière indépendante, solitaire, il faut repousser l'idée que ces deux anticorps répondent à deux récepteurs spéciaux, nettement individualisés, comme s'il s'agissait d'entités entièrement différentes.

Il n'a jamais été observé d'isolysines dans un sérum sans présence simultanée d'agglutinines, avons-nous dit précédemment. Cependant l'on peut nous opposer le cas du sérum des nouveau-nés, qui, malgré un pouvoir agglutinant extrêmement faible ($1/2$) ou nul, possède parfois un titre hémolytique élevé ($1/8$) pour les globules rouges A et B. Ce phénomène, dans lequel l'agglutination paraît être inhibée par l'hémolyse, est difficile à expliquer. En réalité, il est probable qu'il ne s'agit là que d'une exception apparente, car, d'après Thomsen, dans tous les cas où l'on a décelé un pouvoir hémolytique fort chez le nouveau-

né, le sérum de la mère possédait aussi ce pouvoir hémolytique à un titre élevé. Il est donc plausible d'admettre que le sérum hémolytique fort du nouveau-né n'était autre que celui de la mère. Marcussen, Morville, Liedberg et d'autres, partagent cette opinion. Sur 112 nouveau-nés, Marcussen a constaté la présence d'isohémolysines dans 28 cas, soit 25,6 %. Ces hémolysines étaient faibles. En même temps il a pu les déceler chez 95 mères, soit une proportion de 97 %. Dans le sang de tous les nouveau-nés examinés, le complément existait.

Parallélisme dans la disparition des isolysines et des isoagglutinines.

Nous avons mis ce parallélisme en évidence par l'adsorption du sérum étudié au moyen de globules rouges du groupe correspondant de plus en plus vieux.

Le sérum a été mis à la glacière pour favoriser cette adsorption avec des globules de 0 à 4 jours. L'hémolyse et l'agglutination ont été pratiquées avant et après l'adsorption.

Sérum anti-B ou β	Globules rouges B conservés :					
	Frais	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	
Av. adsorption	+	++	+++	++++	++++	Hémolyse
Apr. adsorption	0	0	0	0	0	
Av. adsorption	+	+	+	+	+	Agglutination
Apr. adsorption	0	0	0	0	0	

Nous constatons sur ce tableau que les hémolysines ont disparu, aussi bien que les agglutinines. Après l'adsorption, il y a eu disparition simultanée, parallèle et complète, des deux iso-anticorps. Nous voyons que les iso-anticorps suivent les mêmes lois que les hétéro-anticorps. L'expérience a été refaite avec le sérum α et les globules A, le sérum β et les globules B. Les résultats furent identiques. Le sérum du groupe AB (privé d'agglutinines) n'a donné ni hémolyse, ni agglutination, même avant l'adsorption. Le sérum purifié par le procédé indiqué plus haut n'apporte aucun changement dans cette disparition totale des anticorps.

Identité d'action d'un même milieu chimique sur les deux anticorps.

Comme il fallait s'y attendre pour des anticorps aussi voisins, ils sont influencés de la même manière par l'action d'un même milieu chimique, ou par les variations de ce milieu. C'est ainsi que, dans un milieu où la concentration en électrolytes (NaCl ou CaCl_2 est trop élevée, il y a inhibition des deux séro-réactions à la fois ; l'agglutination comme l'hémolyse ne se produisent plus. Konikov a étudié les deux phénomènes dans des milieux différents, présentant des pH variables. Il a constaté que les zones de pH entre lesquelles s'effectuaient les deux séro-réactions étaient très voisines. Ainsi chez l'homme, le pH optimum pour l'hémolyse se situe entre 3,7 et 4,7 ; pour l'agglutination, entre 4 et 7.

Rapports quantitatifs entre isohémolysines et isoagglutinines.

Les travaux concernant ce sujet sont particulièrement nombreux dans la littérature, et l'accord est loin d'être réalisé entre les auteurs. Quelques-uns, avec Konikov, pensent qu'il existe un rapport quantitatif inverse entre le pouvoir hémolytique et le pouvoir agglutinant, c'est-à-dire que plus l'agglutination est forte, plus l'hémolyse est faible, et vice-versa. D'autres insistent, au contraire, sur la proportionnalité existant entre les titres des deux anticorps : plus le titre agglutinant est élevé, plus le pouvoir hémolytique est fort.

C'est ce que O. Thomsen confirme par ses études sur les rapports entre les titres d'agglutination et d'hémolyse, établis au moyen du même sérum frais et des mêmes globules rouges, et dont les résultats sont présentés dans un tableau que nous reproduisons (en partie).

Groupe des sérums	Hémolyse						Agglutination	
	globules A			globules B			glob. A	glob. B
	1/1	1/2	1/4	1/1	1/2	1/4	1 :	2 :
s. $\alpha\beta$ du groupe O	++	++	+	++	—	—	256	64
$\alpha\beta$ —	++	—	—	—	—	—	32	4
$\alpha\beta$ —	+	—	—	++	+	—	64	64
$\alpha\beta$ —	++	++	+	++	+	—	128	64
$\alpha\beta$ —	++	+	—	++	+	—	256	128
S. β du groupe A	—	—	—	++	++	+	—	128
β —	—	—	—	++	+	—	—	64
S. α du groupe B	++	++	+	—	—	—	256	—
α —	++	—	—	—	—	—	64	—

On remarque sur ce tableau qu'il existe un parallélisme, et même un certain degré de proportionnalité, dans les deux pouvoirs du même sérum. Nous avons pu confirmer les données de Thomsen. Cependant il faut dire que, si dans la plupart des cas cette proportionnalité existe, il faut se garder d'être catégorique, car cette loi souffre quelques exceptions. C'est ainsi que des sérums à pouvoir agglutinant élevé ($1/32$ ou $1/64$) n'ont manifesté qu'un pouvoir hémolytique faible, et inversement, des sérums dont le pouvoir agglutinant était bas ont montré des titres hémolytiques relativement élevés.

Dans les exceptions à la règle de Thomsen, on peut faire entrer les cas du sérum $\alpha\beta$ possédant pour les globules rouges A un pouvoir hémolytique assez élevé et, par contre, un pouvoir agglutinant plutôt faible ($1/16$) ; pour les globules B le pouvoir agglutinant était fort ($1/64$) sans qu'on puisse mettre facilement en évidence le pouvoir hémolytique.

Nous citerons encore un autre exemple observé par nous. Un sérum $\alpha\beta$ donne un titre d'agglutination de $1/32$ aussi bien avec les globules A qu'avec les B, mais par contre, l'hémolyse se manifeste avec beaucoup plus d'intensité lorsqu'il s'agit des globules B que des A.

Constance et variabilité des isolysines et isoagglutinines.

Le rapport quantitatif entre isolysines et isoagglutinines chez un même individu dans les différents

moments de la journée ne varie pratiquement pas. Il est, par ailleurs, très rare qu'un sérum dans lequel on a manifestement constaté un pouvoir hémolytique à un moment donné ne présente plus ce pouvoir lors d'expériences répétées et espacées. Thomsen a observé la constance du pouvoir hémolytique d'un sérum pendant plusieurs années. La même constatation a été faite par d'autres auteurs (Hirszfeld, Lattes, Dujarric de la Rivière et Kossovitch) au sujet du pouvoir agglutinant.

Mais ce qu'il faut signaler, c'est la possibilité d'oscillations dans les titres sans cause apparente.

On sait que les agglutinines apparaissent chez l'enfant entre 3 et 6 mois. D'après Parr, les isolysines et les isoagglutinines apparaissent en même temps chez le nouveau-né. Chez l'enfant d'un an, on peut observer un pouvoir hémolytique déjà très fort. Il s'agit, dans ce cas, d'hémolysines « autochtones » formées par l'enfant même, à l'inverse des hémolysines du sérum du nouveau-né, qui ne sont autres que celles de la mère, comme nous l'avons dit plus haut. Par la suite, le titre du sérum agglutinant augmente avec l'âge, pour arriver à son maximum chez l'adulte (maturité sérologique), puis diminue de nouveau avec les années. Les titres hémolytiques les plus hauts ont été notés entre 5 et 50 ans, ce qui correspond à la période pendant laquelle, le pouvoir agglutinant est également très élevé.

Conclusions.

A la lumière de toute cette étude, les phénomènes d'isohémolyse et d'isoagglutination apparaissent simplement comme des manifestations différentes d'un même anticorps.

Un sérum considéré donnera-t-il, en contact avec les globules rouges, une hémolyse plutôt qu'une agglutination, ou vice-versa ? Cela dépend du degré d'avidité entre l'antigène et l'anticorps en présence. Le taux de leur pouvoir spécifique dépend de cette avidité.

En faveur de cette hypothèse plaident nos constatations,

A la température de 37° , l'isohémolyse s'effectue rapidement, presque en quelques minutes, surtout si la proportion entre sérum et globules a été judicieusement déterminée, parce que, dans ce cas, la fraction avide de l'anticorps se fixe instantanément sur les globules.

Un autre exemple, hautement significatif, est le suivant : Les globules rouges A_1 subissent plus facilement l'hémolyse que les globules A_2 . Un grand nombre d'expériences a démontré que l'avidité existant entre l'anticorps et le récepteur A_1 était beaucoup plus forte qu'entre anticorps et récepteur A_2 . Si l'on utilise des sérums fortement hémolytiques, les globules A_1 sont hémolysés entre 18° et 20° , tandis qu'à cette température les globules A_2 ne subissent que l'agglutination.

Dès lors on s'explique l'existence possible de sérums à pouvoir agglutinant relativement bas et à titre hémolytique élevé, ou au contraire de sérums dont le pouvoir agglutinant fort coïncide avec un pouvoir hémolytique faible, surtout dans le cas où l'on a utilisé pour l'expérience des globules frais et résistants.

En outre, il n'est pas impossible que, dans un sérum, les différentes parties plus ou moins avides perdent progressivement cette avidité avec l'âge. On peut aussi supposer que, chez un individu, les quantités d'anticorps en disparition et en formation s'équilibrent, par conséquent le rapport entre hémolysines et agglutinines reste constant.

Les variations de ce rapport dépendent de la plus ou moins grande avidité de l'antigène pour la fraction spécifique de l'anticorps, ainsi que de la transformation des propriétés physico-chimiques des colloïdes du sérum.

CHAPITRE V

Essai d'une classification des globules rouges humains basée sur les réactions d'isohémolyse.

La classification du sang humain actuellement admise par tous, ou classification classique en 4 groupes : A, B, AB et O, est basée sur l'étude des réactions d'agglutination. L'identification des diverses agglutinines des sérums humains et les agglutinations réciproques que ces sérums déterminent avec certaines catégories de globules rouges à l'exclusion de toutes autres, ont permis d'établir ce classement.

Dès lors, nous appuyant sur les expériences des auteurs déjà cités et sur nos propres recherches, nous avons tenté de réaliser une classification analogue, reposant cette fois, non plus sur la connaissance des iso-agglutinines, mais bien sur celle des iso-lysines des sérums humains.

Notre technique préalable consistait à répartir dans 4 tubes à hémolyse chacun des sérums inconnus à identifier et à mettre en contact avec le sérum successivement des globules rouges A, B, AB et O. Le tout était porté au bain-marie à 37°. Les résultats nous ont tout de suite montré la spécificité de la

réaction et la corrélation existant entre les isolysines et les agglutinines.

Après avoir constaté ce fait, nous avons, suivant le procédé de Landsteiner et Leiner, Hirszfeld et ses collaborateurs, cherché l'existence des deux sangs qui s'hémolysaient réciproquement, c'est-à-dire qu'ayant trouvé un sujet dont le sérum hémolysait les globules d'un autre sujet, il était nécessaire que le sérum de ce dernier sujet hémolyse à son tour les globules du premier individu. Ayant pu réaliser cette combinaison, nous nous sommes servi de ces deux sérums pour continuer à individualiser d'autres groupes.

Nos recherches ont été effectuées avec des globules des 4 groupes, conservés dans des conditions de stérilité parfaite, pour éviter l'apparition du phénomène de Thomsen (panagglutination). L'emploi de globules âgés nous a permis de mettre plus facilement en évidence les hémolysines latentes. Cependant nous n'avons pas utilisé les globules trop vieux donnant une autolyse spontanée, pour ne pas fausser les résultats. Le sérum mis en contact avec ces globules était non chauffé et absolument frais, ce qui est une condition nécessaire si l'on veut éviter les manifestations des anti-hémolysines et si l'on se rappelle que le sérum perd rapidement son pouvoir hémolytique lorsque son complément est détruit.

Cependant, la technique reste délicate, et nombreuses sont les assertions trouvées dans la littérature concernant l'échec de l'hémolyse des globules rouges.

par les iso-sérums. En réalité, plusieurs précautions doivent être observées avec attention pour bien réussir : outre l'emploi du sérum frais, il faut prendre garde de ne pas ajouter au sérum hémolytique des globules rouges en excès, car dans ce cas les isolysines sont partagées entre tous les globules rouges, ce qui affaiblit le pouvoir lytique total du sérum (loi de l'action des masses), au point même d'inhiber complètement l'hémolyse.

Après des recherches assez longues, nous avons reconnu que la meilleure proportion était : 0,2 cc. de sérum frais pour 0,1 cc. d'une émulsion de globules rouges à 5 %. Si l'on augmente progressivement la concentration globulaire, l'hémolyse s'affaiblit jusqu'à disparaître, l'inhibition étant due à l'excès d'antigène (V. Landsteiner et Halbau). Il faut donc chercher chaque fois la proportion optima entre ces deux éléments : dilution du sérum et concentration des globules rouges.

La température joue aussi un rôle important dans l'accomplissement de la réaction : plus elle est élevée, plus la réaction est nette, mais jusqu'à une certaine limite seulement, après laquelle le complément du sérum est détruit. Nous avons toujours travaillé à la température du bain-marie, à 37-38°.

Technique.

Après avoir essayé plusieurs techniques, nous nous sommes arrêtée à la suivante.

Dans 4 petits tubes à hémolyse nous avons mis 0,2 cc. de sérum frais non chauffé et 0,1 cc. d'une émulsion de globules à 5 % conservés 3 ou 4 jours et appartenant aux différents groupes sanguins. Le tout était laissé 1/2 heure au bain-marie à 37°.

Nous avons au préalable effectué le titrage des agglutinines et des hémolysines du sérum étudié au moyen des techniques décrites dans le premier chapitre.

Dans tous les cas où les isolysines ont été difficiles à dépister, nous avons effectué un contrôle avec le sérum chauffé à 56° pendant 30 minutes, auquel on ajoutait du sérum de cobaye dans les proportions suivantes :

Sérum chauffé à 56°.....	0,5 cc.	
Complément à 1/10°.....	0,25 cc.	
Emulsion de gl. rouges à 5 %...	0,5 cc.	bain-marie à 37°
Eau physiologique.....	1,5 cc.	30 minutes

Mais, dans la grande majorité des cas, nous avons travaillé avec le sérum humain frais, qui est rarement privé de complément naturel.

Comme contrôle, nous avons pris des tubes à hémolyse, dans lesquels nous avons seulement mis les globules rouges à étudier en contact avec de l'eau physiologique.

Nous avons ainsi examiné 1.000 sangs (1), dans lesquels nous avons recherché la présence des isohé-

1. Nous remercions ici vivement l'Institut Prophylactique du Professeur Vernes, qui a eu la bonté de nous fournir les sangs sur lesquels nous avons travaillé.

molysines et des isoagglutinines (1), ainsi que les rapports existant entre elles. Après avoir constaté la présence des lysines dans le sérum humain normal et leur action sur les globules rouges humains, nous nous sommes rendu compte que ces réactions d'hémolyse ne se faisaient pas au hasard, mais suivaient au contraire des lois fixes ; une certaine régularité semblait présider à l'accomplissement du phénomène. C'est ainsi que nous avons pu remarquer que certains sérums hémolysaient et agglutinaient tous les globules rouges ; d'autres, au contraire, ne provoquaient ni hémolyse, ni agglutination, quel que soit le groupe des globules rouges mis en contact ; enfin certains sérums et certaines hématies donnaient des hémolyses et des agglutinations réciproques. Ces expériences rendaient éclatant le parallélisme entre les phénomènes d'hémolyse et d'agglutination et permettaient un essai de classification des globules rouges d'après les récepteurs groupes spécifiques.

Nous basant sur les 1.000 sangs examinés sous le rapport des isolysines, nous avons pu dresser à titre d'exemple un tableau-type illustrant les résultats obtenus avec les méthodes exposées précédemment et permettant de suivre le raisonnement déductif et constructif qui a permis d'étayer notre classification.

Voici la méthode que nous avons élaborée et utilisée :

On prend du sang, on le divise en deux parties, de

1. Les résultats d'agglutination ont été publiés dans les Comptes-Rendus de la Société de Biologie.

façon à avoir pour un même sang, d'une part du sérum et d'autre part des globules rouges défibrinés ; on fait alors réagir chaque sérum sur les globules des divers sangs. On a ainsi effectué les réactions croisées entre tous les sérums et tous les globules rouges. On note où se produit l'hémolyse. On peut ainsi « grouper » les sangs et avoir à sa disposition des sérums dont on connaît le pouvoir hémolytique.

Supposons que nous ayons examiné le sang de 10 personnes et que les résultats de cet examen soient ceux que nous présentons dans le tableau ci-dessous :

GLOBULES ROUGES

Sérums		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Formule des sérums	Formules des sangs
	1	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	β	A_β
	2	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	$\alpha\beta$	$O_{\alpha\beta}$
	3	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	β	A_β
	4	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	α	B_α
	5	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	β	A_β
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	AB_0
	7	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	$\alpha\beta$	$O_{\alpha\beta}$
	8	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	α	B_α
	9	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	β	A_β
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	AB_0	
Formules es gl. rouges :		A	O	A	B	A	AB	O	B	A	AB		

+ = hémolyse positive.
— = hémolyse négative.

Les sérums sont marqués en chiffres arabes. Les globules rouges correspondent aux chiffres romains.

L'examen de ce tableau montre :

1^o qu'aucun sérum n'hémolyse ses propres globules rouges ;

2^o que les globules rouges VI et X sont hémolysés par tous les sérums tandis que leurs sérums 6 et 10 n'hémolyse aucun globules rouges.

Ces deux sang appartiennent au même groupe ;

3^o que les globules rouges II et VII ne sont hémolysés par aucun sérum tandis que leurs sérums 2 et 7 hémolysent tous les globules rouges (sauf les leurs). Nous sommes en présence de deux sangs appartenant au même groupe, possédant des hémolysines pour les hématies de tous les autres groupes ;

4^o il existe encore dans notre tableau, six autres sérums, dont le comportement hémolytique ne paraît pas évident. Cependant, en examinant attentivement, nous nous apercevons, que le sérum 1 a hémolysé les globules rouges IV, et que les globules rouges I ont été hémolysés par le sérum 4 ; que le sérum 3 hémolyse les hématies VIII et les hématies III sont hémolysées par le sérum 8 ; que le sérum 5 hémolyse les hématies IV et les hématies V sont hémolysées par le sérum 4.

Il apparaît donc que les sangs 1 et 4, 3 et 8, 5 et 4, 4 et 9 appartiennent à des groupes sanguins différents, qui s'entre-hémolysent réciproquement, c'est-à-dire que le sérum de l'un hémolyse les hématies de l'autre.

et qu'inversement les hématies du premier sont hémolysées par le sérum du dernier. Chacun de ces sérums possède une hémolysine spécifique pour les hématies d'un groupe déterminé. Il y a interaction des hémolysines, hémolyse croisée entre les groupes I et IV, III et VIII, V et IV, IV et IX dans nos exemples.

Interprétations.

Parallèlement à ce travail d'hémolyse, nous avons effectué au moyen des mêmes globules et des mêmes sérums la recherche des agglutinations possibles, et nous avons obtenu un tableau en tous points superposable. Là où il y avait eu hémolyse, il y avait agglutination et inversement, les sérums n'agglutinaient pas non plus leurs propres hématies.

a) Les sérums 6 et 10 n'ont agglutiné aucun globe rouge. Or, nous savons qu'un sérum qui ne possède pas d'agglutinines appartient au groupe sanguin AB, c'est le sérum 0.

b) Les sérums 2 et 7 ont provoqué l'agglutination de tous les globules, sauf les leurs. On ne peut donc être en présence que de sérums $\alpha \beta$ appartenant au groupe O et qui possèdent deux agglutinines α et β pour A et B, et par conséquent pour AB.

c) Avec les sérums 1 et 4, 3 et 8, 5 et 4, nous avons obtenu des agglutinations réciproques, le sérum 1 agglutinant les globules rouges IV et les globules rouges I étant agglutinés par le sérum 4. Il ne pouvait s'agir que de sérums et de globules rouges apparte-

nant aux groupes A et B, α agglutinant A, β agglutinant B. Ultérieurement, la vérification faite avec des sérums étalons a en effet montré que :

les globules I étaient des globules A (sérum 1 = β)
les globules IV étaient des globules B (sérum 4 = α)

D'après toutes ces constatations, nous devons admettre la présence, dans les sérums sanguins, d'isohémolysines ayant un même caractère groupe-spécifique que celui établi pour les isoagglutinines.

Par ailleurs, nous n'avons jamais constaté la présence d'isohémolysines dans le sérum du groupe AB, qui ne renferme pas non plus d'isoagglutinines spécifiques.

Par contre, le groupe O possède deux isohémolysines, et nous avons constaté souvent que celles-ci n'hémolysaient pas également les globules A et B, la fraction anti-A de ce sérum paraîtrait souvent avoir un pouvoir hémolytique plus fort que la fraction anti-B. Il faut aussi noter que le groupe O possède un intérêt tout spécial, puisque les deux hémolysines qu'il renferme sont rigoureusement spécifiques. C'est ce que montre l'expérience suivante.

Après avoir préalablement constaté, dans un sérum du groupe O, la présence des hémolysines anti-A et anti-B, nous avons effectué l'adsorption de ce sérum au moyen des globules rouges B à la température de 0° , suivie de centrifugation à froid, pour séparer les ambocepteurs adsorbés par les globules B. On constate alors que le sérum a perdu son pouvoir hémolytique

(et agglutinant) pour ces globules B, tandis qu'il a conservé le même pouvoir hémolytique pour les globules A.

Conclusions.

En résumé, cette série d'expériences démontre que les sérums humains normaux renferment des iso-hémolysines groupe-spécifique au même titre que les isoagglutinines, hémolysines qui peuvent être classées de la même façon.

Lorsqu'on ne décèle pas la présence de ces hémolysines, il faut incriminer soit le manque d'anticorps spécifique (sérum du groupe AB), soit le manque de complément. Dans presque tous les cas d'échec, il s'agit de la faible concentration des anticorps spécifiques, car le complément, lui, existe pratiquement dans tous les sérums humains (exception de l'ordre de 1 p. 1000). Comme nous l'avons déjà signalé, la réussite dépend souvent des proportions optima que l'on doit rechercher entre le sérum hémolysant et les globules.

Quoi qu'il en soit, le tableau que nous avons dressé illustre clairement le parallélisme existant entre les lois qui régissent l'hémolyse et celles qui régissent l'agglutination.

Ce rapprochement nous a d'ailleurs permis d'identifier les hématies à partir des isolysines, comme cela avait précédemment été fait à partir des isoagglutinines. C'est ainsi que, dans notre tableau, les hématies choisies au hasard de I à X appartenaient dans l'ordre et respectivement aux groupes : A, O, A, B, A, AB, O, B, A et enfin AB.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous voudrions en terminant, dégager de cette étude les points essentiels qui méritent de retenir l'attention.

Nos expériences d'immunisation, d'adsorption et de dissociation nous ont permis de constater :

1° L'étroite parenté reliant les hétéro- et isolysines d'une part aux hétéro- et iso-agglutinines d'autre part ;

2° Cette parenté a pu être établie non seulement avec les sérums et globules rouges humains, mais aussi avec les sérums et globules de mouton ;

3° Une corrélation quantitative entre le pouvoir hémolytique et le pouvoir agglutinant d'un même sérum a été mise en évidence dans la plupart des cas ;

4° Les liens entre les deux anticorps sont tels que nous n'avons jamais pu isoler un sérum qui, possédant le pouvoir hémolytique ne possédait pas en même temps le pouvoir agglutinant ;

5° Nous basant sur les corrélations et l'interdépendance de ces deux anticorps, nous avons pu déterminer les conditions dans lesquelles il était possible

d'établir une classification des sangs humains en fonction des phénomènes d'hémolyse ; classification analogue à celle déjà établie d'après les phénomènes d'agglutination. Après avoir constaté qu'aucun sérum n'hémolyse ses propres globules (de même qu'il n'existe pas d'agglutination entre un sérum et ses globules rouges) nous avons pu classer les hémolysines de la façon suivante :

le sérum du groupe O renferme 2 hémolysines : anti-A et anti-B.

— A — 1 hémolysine : anti-B.

— B — 1 hémolysine : anti-A.

-- AB ne renferme aucune hémolysine.

et réciproquement les globules rouges des différents groupes contiennent les récepteurs correspondants. Par conséquent, dans tous les cas agglutinines et lysines peuvent être classées de la même façon, mais la présence des hémolysines naturelles est souvent plus difficile à dépister que celles des agglutinines et c'est pourquoi nous avons eu recours dans toutes nos expériences à l'emploi des globules rouges humains âgés de plusieurs jours, les globules conservés étant plus sensibles à l'action des hémolysines ;

6° L'agglutination des globules humains se produisant plus aisément que l'hémolyse montre qu'il s'agit d'une réaction plus fine, plus sensible ; l'hémolyse au contraire relève d'un processus infiniment plus complexe nécessitant une assez forte concentration d'anticorps spécifique jointe à la présence du complément. La disparition du complément par une cause quelconque (inactivation à 56°, vieillissement

du sérum, etc.) n'empêche pas l'agglutination d'avoir lieu tandis qu'elle inhibe l'hémolyse ; on peut donc se trouver en présence d'un sérum agglutinant privé de son pouvoir hémolytique normal. Ce fait n'empêche pas de considérer les deux séro-réactions comme deux fonctions différentes d'un seul anticorps et non comme deux anticorps nettement tranchés :

7° A l'inverse des sérums anti-mouton, le sérum anti-homme est caractérisé par l'élévation de son titre agglutinant et la faiblesse de son titre hémolytique. Il est possible d'expliquer l'inégalité des titres en considérant que la dilution du sérum entraîne la diminution du pouvoir complémentaire et par conséquent l'affaiblissement du pouvoir hémolytique.

Vu : le Président de la thèse,
M. TROISIER.

Vu : le Doyen,
M. BAUDOUIN.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. GIDEL.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSEN (T.). — Untersuchungen über die Isohämolyse des Blutes. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1935, t. 85, p. 41.
- ASCOLI (M.). — Isoagglutinine und Isolysine menschlicher Blutsera. *Münch. med. Woch.*, 1901, p. 1239.
- Isoagglutinine ed isolisine dei sieri di sangue umani. *Clinica med. ital.*, 1901, n° 1 et n° 7, p. 398.
- CAMUS (J.) et PAGNIEZ (P.). — Recherches sur les propriétés hémolysante et agglutinante du sérum humain. *Arch. intern. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1902, t. 10, p. 397.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSOVITCH (N.). — Les groupes sanguins. Paris, Baillière et Fils, édit., 1936, t. 1.
- EISENBERG (PH.). — Die Isoagglutinine und Isolysine in menschlichen Seris. *Wien. klin. Woch.*, 1901, p. 1020.
- EHRlich (P.) et MORGENROTH (J.). — Ueber Hamolysine. *Berl. klin. Woch.*, 1900, n° 22, p. 453.
- GRAFE (E.) et GRAHAM (D.). — Untersuchungen über Iso-lyse. *Münch. med. Woch.*, 1911 ; n° 43, pp. 2257 et 2338.
- JERVELL (F.). — Ueber die Wirkung von Isoagglutininen und Isolysinen bei der Bluttransfusion. *Mitteil. aus den Grenzgeb. der Medizin und Chirurgie*, 1922, p. 650-661.

- HAFFNER (F.). — Ueber den Mechanismus von Hämolyse und Agglutination. *Pflüg. Archiv.*, 1922, t. 196, n° 1.
- ALBAN (J.). et LANDSTEINER (K.). — *Münch. med. Woch.*, 1902, p. 473.
- HESSER (S.). — Serological studies of human red corpuscles. *Acta med. Scandinavica*, 1922, t. 57, p. 415.
- HYDE (R. R.). — The reactivation of the natural hemolytic antibody in chicken serum. *Amer. J. of Hyg.*, 1921, t. 1, p. 358.
- KOLMER (J. A.) et MATSUMOTO (M.). — Natural antihuman hemolysins and hemagglutinins in horse sera in relation to serum therapy. *J. of immunol.*, 1920, t. 5, p. 75.
- LANDSTEINER (K.). — Hämagglutination und Hämolyse. *Oppenheim. Hndb. der Biochem.*, 1909, t. 2.
- LANDSTEINER (K.) et LEINER (K.). — Isolysine und Isoagglutinine im menschlicher Körper. *Zentralbl. Bakt.*, 1905, t. 38, p. 548.
- MARCUSSEN (P.). — Ueber das Vorkommen von Isohämolyسين (Isolysinen) bei neugeborenen Kindern. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1935, t. 84, p. 420.
- MEYER (P.). — Sur les rapports entre les propriétés agglutinante et hémolysante des sérums humains. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, t. 94, p. 869.
- Sur l'hémolyse des hématies provenant de sujets dont le sérum est doué de propriétés lytiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, t. 94, p. 872.
- MOSS (W.-L.). — Studies on Isoagglutinins and Isohemolysins *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1910, mars, p. 63.
- MULLER. — Ueber die Erzeugung hämolytischer Amboceptoren durch Seruminjektion. *Münch. med. Woch.*, 1902, t. 49, n° 32, p. 1330.

- MULLER (P. TH.). — Aviditätsstudien an Hämolytinen und Agglutininen. *Arch. f. Hyg.*, 1908, t. 64, p. 62.
- MUTERMILCH. — Hémolysines naturelles et hémolysines artificielles. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, p. 1002.
- OTTENSOOSER (F.). — Untersuchungen über Isoagglutinogene. *Zentralbl. Bakt.*, 1931, t. 122, p. 73.
- PAAR (L. W.). — On isohemagglutination, the hemolytic index and hetero-hemagglutination. *J. inf. Dis.*, 1930, t. 46, p. 173.
- REPLOH (H.) et BOTTICHER (H.). — Versuche über die gegenseitige Absättigung von Hämolytinen und Agglutininen. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1936, t. 89, p. 107.
- SACHS (H.). — Hämolytische Serumwirkung (Hämolytine) und Komplementbindung (Cytotoxische Sera). *Hndb. der path. Mikroorg. Kolle-Wasserm.*, 1929, 3^e édit., p. 779.
- SANDSTROM (L.). — Die Agglutinabilität (Empfindlichkeit) gegen Isoagglutinine von in verschiedener Weise aufbewahrten Menschenblut. *Acta Path. microb. Scandinavica*, 1927, t. 4, p. 260.
- SCHIFF (F.) et ADELSBERGER (L.). — Ueber Blutgruppenspezifische Antikörper und Antigene. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1924, t. 40, p. 335.
- THOMSEN (O.). — Ueber das Verhältnis zwischen Isolysin und Isoagglutinin. *Ztschr. f. Rassenphysiol.*, 1935, t. 7, p. 1.
- Der Unterschied in dem Verhalten der beiden menschlichen A. Blutgruppen (A et A₁) gegenüber Anti-A-Lysin (in O- und B-Sera). *Münch. med. Woch.*, 1930, n° 2, p. 1190.
- TROISIER (J.). — Rôle des hémolysines dans la genèse des pigments biliaires et de l'urobiline. Thèse Paris, 1910.

VEDDER (E. B.). — The production of anti-human hemolysin. *J. of Immunol.*, 1919, t. 3, p. 141.

WIDAL (F.) et WEISSENBAACH (R. J.). — Contribution à l'étude des sensibilisatrices hémolytiques naturelles du sérum humain. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. 75, p. 162.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. — <i>Etude des hétéro-anticorps</i>	4
A. Parallélisme dans l'apparition des anticorps hémolytique et agglutinant	8
B. Parallélisme dans la disparition des deux anti- corps.....	16
C. Interprétation des phénomènes	21
CHAPITRE II. — <i>Historique de la découverte des hémoly- sines et agglutinines</i>	24
CHAPITRE III. — <i>Mise en évidence des isolysines dans les sérums normaux</i>	31
Groupes sanguins	32
Augmentation du titre hémolytique par emploi de globules rouges conservés.....	34
Sensibilisation de la réaction d'hémolyse par action de la chaleur sur les globules rouges frais.....	37
Modification portant sur le sérum.....	38
Anti-hémolysine du sérum humain normal.....	42
Proportionnalité du pouvoir hémolytique et agglu- tinant	43
Application de ces notions théoriques à l'étude de la transfusion sanguine.....	44

CHAPITRE IV. — <i>Rapport entre les Isolysines et Isoagglutinines dans le sérum humain</i>	49
Parallélisme dans la disparition des Isolysines et Isoagglutinines.....	51
Rapport quantitatif entre Isolysines et Isoagglutinines.....	53
Constance et variabilité des Isolysines et Isoagglutinines.....	54
CHAPITRE V. — <i>Essai d'une classification des globules rouges humains basée sur les réactions d'isohémolyse</i>	58
Technique.....	61
Interprétations.....	65
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	71

